



**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA**  
**FACULTAD DE BIOLOGÍA**  
**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**Mecanismos reguladores de la apoptosis, inflamación y de la transición  
epitelio-mesénquima: Intervención terapéutica en la enfermedad renal  
experimental**

**Trabajo presentado por Sergio Berzal Gómez,**  
**licenciado en Bioquímica, para optar**  
**al grado de Doctor**

**Directores:**

**Dr. Adrián Mario Ramos**

**Dr. Alberto Ortiz Arduán**

**Laboratorio de Diabetes y Patología Renal y Vascular**

**División de Nefrología e Hipertensión**

**Instituto de Investigación Sanitaria de la Fundación Jiménez Díaz**

**Madrid, 2014**











Este trabajo ha sido realizado en el Instituto de Investigaciones Sanitarias-Fundación Jiménez Díaz (IIS-FJD), en el laboratorio de Diabetes y Patología Renal y Vascular, bajo la dirección del Dr. Adrián Mario Ramos y el Dr. Alberto Ortiz Arduán y con la ayuda de la Fundación Conchita Rábago de Jiménez Díaz, la red de investigación renal (Redinren) y del Fondo de Investigaciones Sanitarias, Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Ciencia e Innovación, Madrid 2014.









Don **Adrián Mario Ramos**, Doctor en Ciencias Químicas e Investigador asociado al Laboratorio de Diabetes y Patología Renal y Vascular del IIS-FJD, y Don **Alberto Ortiz Arduán**, Doctor en Medicina y Profesor Asociado de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid,

**CERTIFICAN:**

que Don **Sergio Berzal Gómez**, Licenciado en Bioquímica por la Universidad Autónoma de Madrid, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado **Mecanismos reguladores de la apoptosis, inflamación y de la transición epitelio-mesénquima: Intervención terapéutica en la enfermedad renal experimental**, y que una vez revisado, reúne todos los requisitos exigidos de calidad y originalidad para optar a grado de Doctor.

En Madrid, a 4 de Junio de 2014

Dr. Adrián Mario Ramos

Dr. Alberto Ortiz Arduán









"Nunca consideres el estudio como una obligación, sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber"

Albert Einstein

"No es el conocimiento, sino el acto de aprendizaje, y no la posesión, sino el acto de llegar a ella, lo que concede el mayor disfrute"

Carl Friedrich Gauss









*Indice*



<b>Abreviaturas</b>	3
<b>Introducción</b>	7
<b>1. Riñón y su patología</b>	9
1.1. El riñón: estructura y función	9
1.2. Alteraciones agudas y crónicas de la función renal	10
<b>2. Procesos celulares patológicos y patología celular que contribuyen al fracaso renal agudo y a la enfermedad renal crónica</b>	11
2.1. Muerte celular	11
2.1.1. Apoptosis	12
2.2. Inflamación	14
2.2.1. Citoquinas, quimioquinas y receptores de citoquinas en el daño renal	15
2.2.2. NF- $\kappa$ B	16
2.3. Transición epitelio-mesénquima	18
2.3.1. Transición epitelio-mesénquima en la patología renal	19
2.3.2. Inductores moleculares de la TEM en el tejido renal	19
2.3.3. La familia de factores de transcripción Snail y su regulación	20
2.3.4. Pérdida del funcionalismo celular por TEM	21
2.4. Fibrosis renal	22
2.4.1. Participación de la TEM en la fibrosis renal	22
<b>3. Moléculas exógenas y endógenas que contribuyen al daño renal</b>	23
3.1. Inhibidores de calcineurina	24
3.1.1. Función de la calcineurina y los efectos de su inhibición	24
3.1.2. Ciclosporina A	24
3.1.3. Tacrolimus	25
3.2. TWEAK	28

<b>4. Relaciones entre inflamación y TEM/Fibrosis renal: Papel de NF-κB</b>	28
<b>5. Nanomedicinas</b>	30
5.1. Polímeros terapéuticos	30
5.2. Utilización de conjugados poliméricos inhibidores del apoptosoma como modelo de nanomedicinas de potencial uso clínico	31
<b>Objetivos</b>	35
<b>Materiales y métodos</b>	39
<b>Cultivos celulares</b>	41
Células MCT	41
Células HK2	41
Células MEF-Apaf <sup>-/-</sup> y MEF-Apaf <sup>+/+</sup>	41
<b>Protocolo experimental general</b>	41
<b>Silenciamiento génico, incorporación de plásmidos y ensayo luciferasa o de gen reportero</b>	42
Silenciamiento génico	42
Incorporación de plásmidos	43
Ensayo luciferasa	43
<b>Análisis proteicos</b>	43
Extracción de proteínas	43
ELISA	44
Western Blot	44
Inmunofluorescencia	45
Ensayo de retardo de la movilidad electroforética (EMSA)	46
<b>Análisis génico</b>	47
Extracción de ARN	47
RT-PCR	47
<b>Apoptosis y muerte celular</b>	47



<b>Ensayo de cierre de herida</b>	48
<b>Experimentación con animales</b>	49
Modelo fracaso renal agudo (inyección de ácido fólico)	49
Modelo murino de Obstrucción Ureteral Unilateral (UUO)	49
Estudios histológicos	49
Ensayo TUNEL®	50
<b>Síntesis del QM56</b>	50
<b>Análisis estadísticos</b>	51
<b>Composición y uso de los medios de cultivo</b>	52
RPMI-1640	52
DMEM	52
Opti-MEM®I	52
<b>Composición y uso de soluciones tamponadas</b>	52
PBS	52
Trypsina-EDTA	52
TBS y TBS-T	52
Suero salino fisiológico	53
Tampón extracción proteínas totales	53
Tampón A de EMSA	53
Tampón C de EMSA	53
Tampón de unión de EMSA	53
Solución de tinción para citometría de flujo	53
<b>Productos y casas comerciales</b>	54
Kits comerciales	54
Instrumentación	56

## **Resultados .....57**

### **Parte I: Estudio de los mecanismos de la transición epitelio-mesénquima inducido por los inhibidores de calcineurina ciclosporina A y tacrolimus en el epitelio tubular renal .....59**

1.1. La ciclosporina A induce la reorganización del citoesqueleto de actina de forma independiente de la acción del TGF- $\beta$ 1 y de la producción de apoptosis .....59

1.2. La ciclosporina A reduce la expresión de proteínas de las uniones adherentes y estrechas e induce la transición epitelio-mesénquima en células tubulares. Relación con la acción del TGF- $\beta$ 1 y con la reorganización del citoesqueleto de actina .....61

1.3. Papel de TGF- $\beta$ 1 en la expresión de marcadores epiteliales o mesenquimales inducidos por ciclosporina A en células tubulares renales humanas .....63

1.4. La pérdida de proteínas de uniones adherentes y estrechas inducidas por la ciclosporina A es independiente de la apoptosis .....64

1.5. La estabilización del factor de transcripción Snail es responsable de la modulación negativa de cadherina-E producida por ciclosporina A .....66

1.6. Papel de la enzima GSK3 en la regulación de las proteínas de adhesión por ciclosporina A .....70

1.7. El tacrolimus mimetiza los efectos de ciclosporina A y regula la ruta GSK3/ Snail/Cadherina-E en células tubulares renales .....72

### **Parte II: Estudio de los mecanismos de la transición epitelio-mesénquima inducido por la citoquina TWEAK en el epitelio tubular renal .....75**

2.1. TWEAK induce la pérdida de proteínas de adhesión y la TEM de células tubulares renales .....75

2.2. La expresión incrementada de  $\alpha$ SMA tubular durante la lesión renal obstructiva experimental esta disminuida en ratones deficientes para TWEAK ...80

2.3. La TEM inducida por TWEAK en células tubulares es independiente del TGF- $\beta$ 1 .....80

2.4. Papel de mediadores proinflamatorios en la TEM inducida por TWEAK en células tubulares: participación de NF- $\kappa$ B .....82

2.5. Papel de mediadores proinflamatorios en la TEM inducida por TWEAK en células tubulares: participación de la MAP quinasa ERK1/2 .....84

2.6. La regulación negativa del receptor VDR es un mediador de la TEM inducida por TWEAK en células tubulares .....	84
<b>Parte III: Estudio de los mecanismos de acción de la nanomedicina polimérica QM56 en la prevención del daño renal inducido por inhibidores de calcineurina y TWEAK .....</b>	<b>89</b>
3.1. QM56 inhibe la apoptosis y reduce la expresión de quimioquinas producidas por citoquinas proinflamatorias y por ciclosporina A en células tubulares renales .....	89
3.2. QM56 evita el aumento de expresión de quimioquinas inducido por TWEAK en ausencia de apoptosis .....	91
3.3. QM56 inhibe la respuesta inflamatoria en células deficientes en Apaf-1 ...	92
3.4. QM56 previene la actividad transcripcional dependiente de NF- $\kappa$ B sin afectar su translocación y unión al ADN .....	94
3.5. La inhibición de JAK2 previene el aumento de los niveles de mensajero de quimioquinas inducido por TWEAK .....	94
3.6. QM56 evita la activación de la ruta JAK2/STAT3 en células tubulares y en MEF deficientes en Apaf-1 .....	96
3.7. QM56 interfiere con eventos de fosforilación reguladores de la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B .....	96
3.8. QM56 reduce el daño renal en un modelo de fracaso renal agudo .....	99
<b>Discusión .....</b>	<b>105</b>
Parte I: Estudio de los mecanismos de la transición epitelio-mesénquima inducida por los inhibidores de calcineurina ciclosporina A y tacrolimus en el epitelio tubular renal .....	107
Parte II: Estudio de los mecanismos de la transición epitelio-mesénquima inducida por la citoquina TWEAK en el epitelio tubular renal .....	111
Parte III: Estudio de los mecanismos de acción de la nanomedicina polimérica QM56 en la prevención del daño renal inducido por inhibidores de calcineurina y TWEAK .....	114
<b>Conclusiones .....</b>	<b>117</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>121</b>
<b>Artículos publicados .....</b>	<b>145</b>





*Abreviaturas*



<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>AF</b>	Ácido fólico
<b>Ang II</b>	Angiotensina 2
<b>AP-1</b>	Proteína activador 1
<b>Apaf-1</b>	Apoptosis protease-activating factor 1
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNm</b>	ARN mensajero
<b>ATF</b>	Factor de activación de transcripción
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b>BMP-7</b>	Proteína morfogenética de hueso
<b>BSA</b>	Albumina de suero bovino
<b>CARD</b>	Dominio de reclutamiento de caspasas
<b>CCR</b>	Receptor de quimioquinas C-C
<b>CHOP</b>	Proteína homóloga de CEBP
<b>CHX</b>	Cicloheximida
<b>CNI</b>	Inhibidor de calcineurina
<b>CsA</b>	Ciclosporina A
<b>CTGF</b>	Factor de crecimiento del tejido conectivo
<b>CXCR</b>	Receptor de quimioquinas C-X-C
<b>DAPI</b>	4',6-diamidino-2-phenylindole
<b>DFBS</b>	Suero fetal bovino de complementado
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetracético
<b>EMSA</b>	Ensayo de retardo de la movilidad electroforética
<b>EndTEM</b>	Transición Epitelio-Mesenquima endotelial
<b>ERC</b>	Enfermedad renal crónica
<b>ERK</b>	Quinasas reguladas por señales extracelulares
<b>ERT</b>	Enfermedad renal terminal
<b>FAK</b>	Quinasa de adhesión focal
<b>FGF</b>	Factor de crecimiento fibroblástico
<b>FKBP12</b>	Proteína de unión 2 con tacrolimus (FK506)
<b>FRA</b>	Fracaso renal agudo
<b>Gapdh</b>	Gliceraldehído fosfato deshidrogenasa
<b>GFP</b>	Proteína fluorescente verde
<b>GSK3</b>	Glucógeno sintasa quinasa 3
<b>HGF</b>	Factor de crecimiento hepático
<b>HIF-1<math>\alpha</math></b>	Factor inducible por hipoxia 1 alfa
<b>HNF1<math>\beta</math></b>	Hepatocyte nuclear factor 1 homeobox B
<b>HO-1</b>	Hemo oxigenasa 1
<b>IF</b>	Inmunofluorescencia
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	Interferón gamma
<b>IgA</b>	Inmunoglobulina A
<b>IGF-IR</b>	Type I insulin-like growth factor receptor
<b>IKK</b>	Quinasa de I $\kappa$ B
<b>IL</b>	Interleuquina

<b>IP</b>	Ioduro de propidio
<b>ITS</b>	Insulina/transferrina/selenio
<b>I<math>\kappa</math>B</b>	Inhibidor de $\kappa$ B
<b>JAK2</b>	Janus kinase 2
<b>JNK</b>	Quinasa c-Jun N-terminal
<b>Jspk</b>	Jasplakinolide
<b>LiCl</b>	Cloruro de Litio
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido
<b>MAPK</b>	Proteína quinasa activada por mitógenos
<b>MCP-1</b>	Monocyte chemotactic protein 1
<b>MEC</b>	Matriz extracelular
<b>MIP-1<math>\alpha</math></b>	Proteína 1 alfa inflamatoria de macrófagos
<b>MMPs</b>	Metaloproteasas
<b>NFAT</b>	Factor nuclear del linfocito T activado
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
<b>NLS</b>	Secuencia de localización nuclear
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>Nrf2</b>	Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2
<b>NTA</b>	Necrosis tubular aguda
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>PCT</b>	Paricalcitol
<b>PDGF</b>	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
<b>PFA</b>	Paraformaldehído
<b>PGA</b>	Ácido poli-L-glutámico
<b>RANTES</b>	Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted
<b>RHD</b>	Dominio de homología Rel
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>RT-PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico
<b>STAT</b>	Signal Transducer and Activator of Transcription
<b>TA</b>	Temperatura ambiente
<b>TAK-1</b>	Proteína quinasa activada por TGF- $\beta$ 1
<b>TBS-T</b>	Tampón tris salino - Tween
<b>TEM</b>	Transición epitelio-mesénquima
<b>TGFR</b>	Receptor de TGF- $\beta$ 1
<b>TGF-<math>\beta</math>1</b>	Factor de crecimiento transformante beta 1
<b>TLR</b>	Toll-like receptor
<b>TME</b>	Transición mesenquimal-epitelial
<b>TNFR</b>	Receptor del TNF alfa
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral alfa
<b>TWEAK</b>	Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis
<b>UPR</b>	Unfolding protein response
<b>UO</b>	Obstrucción unilateral del uréter
<b>VDR</b>	Receptor de vitamina D
<b>WB</b>	Western blot



**ZO-1**  
 **$\alpha$ SMA**

Zonula occludens 1  
Actina alfa de músculo liso





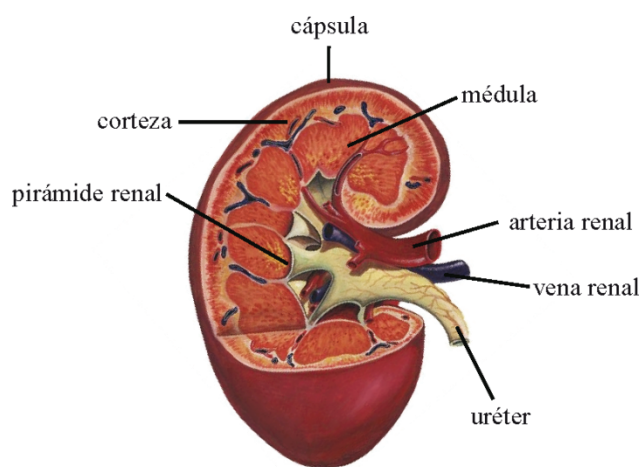
# *Introducción*



## 1. El riñón y su patología

### 1.1. El riñón: estructura y función

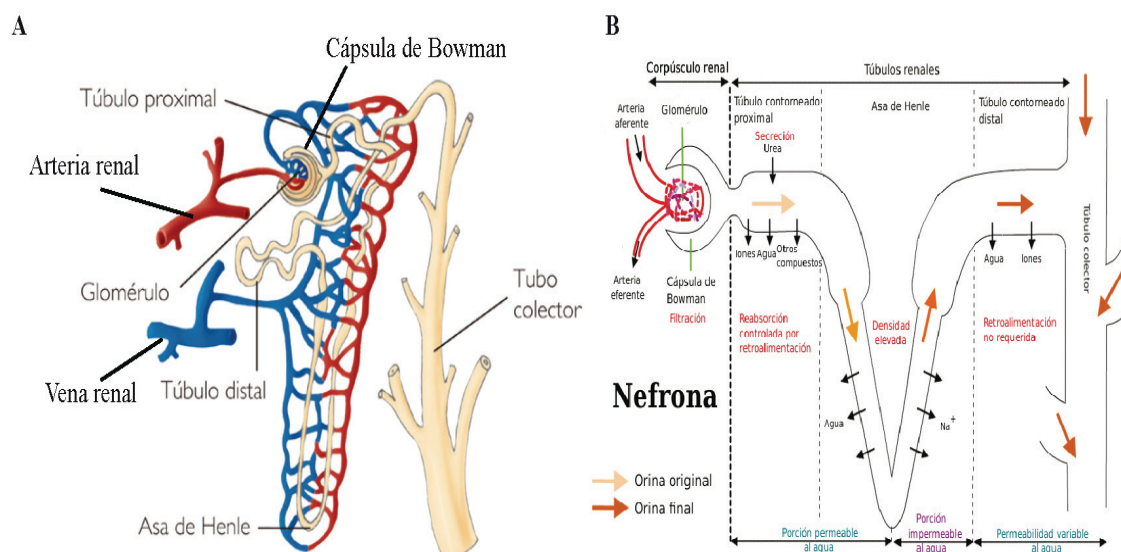
El riñón es un órgano par que forma parte del sistema excretor de los organismos vertebrados. En los humanos se encuentran en la parte posterior del abdomen, uno a cada lado de la columna vertebral. La principal función de los riñones es purificar la sangre que fluye por el aparato circulatorio mediante un complejo sistema de filtración, reabsorción y secreción, por el cual los metabolitos nitrogenados y otros productos de desecho son eliminados a través de la orina. Además, el riñón realiza una importante función homeostática regulando el volumen de los fluidos extracelulares, la eritropoyesis, la presión arterial y el metabolismo mineral mediante la producción de orina y de diversas hormonas como la eritropoyetina, la renina y la vitamina D.



**Figura 1. Anatomía del riñón.** Sección frontal de un riñón donde se han señalado las estructuras más importantes del órgano.

Estructuralmente, el riñón está dividido en corteza y médula. La corteza es la zona externa situada inmediatamente debajo de la cápsula renal (capa de tejido conectivo que rodea el riñón), y la médula es la zona más interna. La corteza renal contiene la gran mayoría (75%) de los glomérulos y túbulos proximales o distales del riñón y de esta zona surgen las columnas de Bertin que separan cada unidad individual de médula (Figura 1). La unidad funcional básica del riñón es la nefrona. Existen nefronas cuya estructura se encuentra mayormente situada en la corteza (corticales) y otras ubicadas entre corteza y médula (yuxtamedulares). Un riñón humano sano posee de uno a tres millones de nefronas y cada una de estas se divide en 4 zonas: el corpúsculo renal que comprende dos estructuras: el glomérulo y la cápsula de Bowman; los túbulos cortorneados proximal y distal, y entre ambos, el asa de Henle. El glomérulo es una red de capilares sanguíneos dispuestos en ovillo que por uno de sus extremos recibe sangre de la arteriola aferente proveniente de la circulación renal, mientras que por el extremo opuesto la sangre es retirada mediante la arteriola eferente. Mediante un mecanismo de diferencia de presiones, la sangre que llega al glomérulo es filtrada hacia el espacio de la cápsula de Bowman mientras que la formación de la orina mediante procesos de reabsorción y secreción ocurre en los túbulos contorneados proximales y distales y en el asa de Henle. Cada una de estas zonas

presenta características particulares de selectividad en la permeabilidad de diferentes solutos (Figura 2).



**Figura 2. Estructura básica y contexto anatómico (A) y funcionamiento de la nefrona renal (B).** En la parte izquierda se muestra un esquema de los componentes básicos de la nefrona y del sistema circulatorio asociado. A la derecha se muestra de forma simplificada el proceso de filtración y reabsorción que ocurre en la nefrona y que resulta en la formación de orina.

### 1.2. Alteraciones agudas y crónicas de la función renal

Casi todas las enfermedades renales conocidas que afectan a los seres humanos producen un efecto perjudicial sobre el funcionamiento de las nefronas. Esto impide una correcta eliminación de las toxinas o desechos que produce el organismo, que se acumulan en la sangre de forma aguda o crónica.

El fracaso renal agudo (FRA) es un síndrome clínico caracterizado por la pérdida acusada de la función renal que conduce a un incremento del nivel de toxinas urémicas en la sangre, deletéreas para el propio riñón y otros sistemas orgánicos (Bellomo R, 2004; Bellomo R, 2012; Hilton R, 2011). El FRA reconoce una serie de factores etiopatogénicos, entre ellos: la acción de sustancias nefrotóxicas, contaminantes ambientales, venenos y fármacos, toxinas bacterianas, obstrucciones del tracto urinario o episodios isquémicos (Sanz AB, 2013). El FRA es reversible pero puede resultar en la necesidad de terapia de reemplazo de la función renal fisiológica por diálisis (Hsu CY, 2007). Incluso cuando no es necesaria esta terapia, el FRA es aún un desorden serio que confiere un elevado riesgo de muerte e incrementa el riesgo de sufrir enfermedad renal crónica (ERC) (Coca SG, 2009; Coca SG, 2011; Hoste EA, 2006; Murugan R & Kellum JA, 2011; Van Berendoncks AM, 2010). En la ERC, el daño renal es permanente e irreversible y se caracteriza por una reducida tasa de filtrado glomerular (inferior a  $60 \text{ mL/min/1,73 m}^2$ , en

comparación a los 90 mL/min/1,73 m<sup>2</sup> o superior en una persona sana) (Coresh J, 2007) o proteinuria. Histológicamente, la pérdida de funcionalidad se debe a un reemplazo progresivo de las nefronas funcionales por tejido de cicatrización. La ERC puede establecerse a partir de procesos patológicos subyacentes al FRA o ser la consecuencia de numerosas enfermedades de origen metabólico y genético, hipertensión, diabetes, acumulación de metales pesados y bajo peso o prematuridad al nacer (Boubred F, 2013; Chawla LS & Kimmel PL, 2012; Staples A & Wong C, 2010). Estudios realizados tanto en los Estados Unidos como en Europa estiman que el porcentaje de población con ERC es de entre un 5% y un 15% de la población (Nissenson AR, 2001; European Kidney Health Alliance, 2010; USRDS Annual Data Report, 2008).

De modo importante, la persistencia de la ERC o un episodio grave e irreversible de FRA puede tener como consecuencia la aparición de la enfermedad renal terminal (ERT), definida por una tasa de filtrado glomerular menor a 15 mL/min/1,73 m<sup>2</sup>. La ERT es la insuficiencia total del funcionamiento del sistema excretor urinario. Diferentes estudios coinciden en señalar a la ERC y a la ERT como entidades clínicas que comprometen seriamente las expectativas de vida. Se ha estipulado que pacientes en diálisis con ERT en la franja etaria entre 20 y 25 años alcanzan un índice de mortalidad, principalmente debido a afectaciones cardiovasculares, similar a individuos mayores de 80 años pertenecientes a la población general (De Jager DJ, 2009; Levey AS, 1998).

El FRA y la ERC han sido recientemente reconocidos como síndromes clínicos integrados debido a que la ocurrencia de uno puede incrementar el riesgo para la aparición del otro (Chawla LS & Kimmel PL, 2012; Coca SG, 2011; Coca SG, 2012). De hecho, en ambas patologías se desencadenan en el riñón procesos fisiopatológicos comunes que incluyen respuestas adaptativas y patológicas tales como la ocurrencia de muerte celular, proliferación, indiferenciación celular e inflamación que determinan en conjunto un deterioro del filtrado glomerular (Chawla LS & Kimmel PL, 2012; Coca SG, 2011; Coca SG, 2012).

## **2. Procesos celulares patológicos que contribuyen al fracaso renal agudo y a la enfermedad renal crónica**

Entre los procesos celulares que contribuyen al daño renal destacamos la muerte celular, la inflamación, la transición epitelio-mesénquima y la fibrosis.

### **2.1. Muerte celular**

La muerte celular juega un papel muy importante en la patología renal, en particular en el FRA. El origen renal más común del FRA es la necrosis tubular aguda (NTA) caracterizada por la

muerte de células del túbulo renal que provoca un deterioro agudo de la función del órgano que puede requerir diálisis (Bonventre JV & Yang L, 2011; Olsen TS, 1985; Solez K, 1979). El término necrosis es usado en la actualidad para definir aspectos más relacionados con la clasificación histopatológica de la lesión renal. Bioquímicamente, la necrosis es un proceso poco regulado o accidental y requiere escasa energía. Este tipo de muerte puede ser ocasional y estar asociada a lesiones muy severas del órgano. Por el contrario, la pérdida de células tubulares o de otros epitelios por apoptosis o muerte celular programada durante la enfermedad renal, es un proceso más frecuente. La apoptosis se caracteriza por ser dependiente de energía para su ejecución y por ser un proceso controlado tanto a nivel génico como por modificaciones postraduccionales de algunas de las proteínas que intervienen en el mismo (Lieberthal W & Levine JS, 1996, Shimizu A & Yamanaka N, 1993; Ueda N, 2000). Además, en estudios realizados en células en cultivo y en tejido renal provenientes de modelos experimentales y de humanos, ocurren otros tipos de muerte celular provocados por diversos mecanismos que están emparentados con la necrosis por ser independientes de caspasas, pero que están sujetos a eventos regulatorios como la apoptosis. Entre ellos se cuenta a la autofagia, la piroptosis y la necroptosis. La necroptosis ha sido reseñada como una forma de muerte relevante en el daño agudo isquémico (Huber TB, 2012; Krautwald S & Linkermann A, 2013; Linkermann A, 2013).

### 2.1.1. Apoptosis

La apoptosis es un proceso fisiológico que regula el número de células del organismo en un amplio número de procesos biológicos como el desarrollo embrionario, la vigilancia inmunológica y la homeostasis tisular (Riedl SJ & Salvesen GS, 2007; Sanz AB, 2008). Básicamente, el proceso de apoptosis consiste en la eliminación fisiológica de las células redundantes y defectuosas mediante el desmantelamiento de sus estructuras celulares de forma no inmunogénica. Las caspasas, proteínas intracelulares con actividad cistein-proteasa, son las moléculas ejecutoras clave del proceso de apoptosis. La mayoría se sintetizan como procaspasas inactivas y durante la apoptosis son activadas mediante proteólisis (Thornberry NA & Lazebnik Y, 1998). Debido a su naturaleza degradativa, las caspasas inactivan proteínas antiapoptóticas como Bcl-xL y Bcl-2, proteolizan proteínas estructurales y activan ADNasas (Ortiz A, 2003). Se han descrito dos vías principales de activación de la apoptosis, denominadas extrínseca e intrínseca (Ashkenazi A & Dixit VM, 1999; Kroemer G, 2005; Thorburn A, 2004). Las principales características para cada una de ellas son:

Vía extrínseca: Se induce por moléculas extracelulares o ligandos que se unen a receptores transmembrana de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNFR). Los modelos mejor caracterizados son los de FasL/Fas y TNF- $\alpha$ /TNFR1. La unión de FasL a su receptor Fas recluta a la proteína adaptadora FADD, que une a la procaspasa-8 e induce su procesado y



activación. A su vez, la caspasa 8 procesa y activa a las caspasas efectoras, entre ellas a las caspasas 3, 6 y 7, que son las responsables de degradar el material genético y proteínas nucleares y del citoesqueleto (Sanz AB, 2008; Thorburn A, 2004).

Vía intrínseca: Se induce por señales intracelulares desencadenadas por daños en el ADN o por estrés que involucra a orgánulos como el retículo endoplásmico y a la mitocondria. Se produce por la activación de proteínas de la familia Bcl-2 que regulan la permeabilización de la membrana mitocondrial externa y la liberación de citocromo C hacia el citoplasma. El citocromo C junto con el dATP se unen a la proteína Apaf-1 (*Apoptosis protease-activating factor-1*) permitiendo la exposición del dominio de reclutamiento de caspasas (CARD) y su unión a la procaspasa-9. Este complejo macromolecular se denomina apoptosoma y su función es procesar y activar a la procaspasa-9. Una vez activa, esta caspasa actúa sobre caspasas efectoras que digieren moléculas esenciales para la viabilidad celular (Li P, 1997; Riedl SJ & Salvesen GS, 2007; Sanz AB, 2008).

Se ha documentado muerte celular por apoptosis en el transcurso de lesión renal aguda y crónica experimental y clínica (Ortiz A, 2000; Ortiz A, 2001). La apoptosis que sufren tanto las células renales intrínsecas como los leucocitos infiltrados en el tejido renal contribuye a la patogénesis de la enfermedad renal.

El papel de la apoptosis de las células renales intrínsecas puede variar en el curso de la lesión renal, ya que puede desencadenarse como una respuesta adaptativa al daño para eliminar células no funcionales y dar lugar a fenómenos regenerativos o bien un mecanismo para la persistencia y progresión del daño renal (Ortiz A, 2000; Ortiz A, 2001). Así, en diversos modelos experimentales se ha demostrado que la apoptosis del epitelio de los túbulos proximales es el disparador del daño generalizado sufrido por el riñón durante el FRA (Grgic I, 2012; Sekine M, 2012; Zhang MZ, 2012).

Además, datos obtenidos en modelos experimentales de daño renal sugieren que la apoptosis coexiste con la proliferación del epitelio tubular. En ese caso la apoptosis se comporta como un balance fisiológico que resuelve una proliferación compensatoria exagerada en respuesta a una lesión o daño, como el que se produce en la glomerulonefritis proliferativa o en la hiperplasia tubular en la fase de recuperación del FRA (Olsen TS, 1985; Ortiz A, 2001). Por otro lado, una insuficiente apoptosis de los fibroblastos intersticiales durante la cicatrización renal puede promover la fibrosis (Ortiz A, 2001).

Una alta tasa de apoptosis que persiste más allá de la recuperación del número de células normales de un tejido, conduce hacia la pérdida de células del parénquima renal que caracteriza a la progresión de esclerosis glomerular o atrofia tubular. La contribución de esta apoptosis persistente ha sido estudiada en modelos experimentales de cicatrización glomerular progresiva (Ortiz A, 2001; Shimizu A, 1997). Una mayor tasa de apoptosis fue observada también en nefritis proliferativas humanas (Ortiz A, 2001).

### 2.2. Inflamación

Como consecuencia de un daño o lesión, las células renales secretan citoquinas proinflamatorias que participan en varias etapas del proceso inflamatorio (Butcher EC & Picker LJ, 1996; Weber C, 1996). Estas citoquinas inducen en las células endoteliales la expresión de selectinas y adhesinas implicadas en el anclaje de los leucocitos a la pared de los vasos sanguíneos, así como el aumento de la expresión de integrinas leucocitarias (Crockett-Torabi E, 1998; Emery P & Salmon M, 1991; Brady HR, 1994; Segerer S, 2000). Estas facilitan la circulación de los leucocitos por la superficie vascular propiciando las interacciones con la pared endotelial y su extravasación hacia el espacio extravascular en el tejido dañado (Campbell JJ, 1997; Segerer S, 2000). Una vez allí y mediante citoquinas ambientales se produce su diferenciación a distintas estirpes celulares de la respuesta inmune innata como macrófagos, células dendríticas y “natural killer”. Estas células así diferenciadas, propician a su vez la inducción de poblaciones de linfocitos reguladores y efectores a través de la síntesis de factores proinflamatorios. Todas las células renales, y en particular las células tubulares que componen la mayoría de la masa funcional, son capaces de producir quimioquinas y citoquinas en respuesta a estímulos inmunitarios o no inmunitarios (Grande MT & López-Novoa JM, 2008). Durante la enfermedad renal, la infiltración de células inmunitarias desempeña un papel central en la génesis del daño agudo y de la fibrosis característica de la enfermedad crónica. Se ha descrito que el tratamiento con micofenolato mofetilo, un inmunosupresor que actúa sobre la proliferación de linfocitos B y T, previene la hipertensión y la lesión del glomérulo renal inducida por una dieta alta en grasas (Spradley FT, 2013), es eficaz en el tratamiento de la nefritis lúpica (Condon MB, 2013) y es capaz de reducir la expresión del TLR-4 de monocitos y el daño renal en un modelo de isquemia-reperfusión llevado a cabo en ratones (Zhang YX, 2013).

Una vez que el daño es reparado es muy importante la inactivación y eliminación de las células inmunoelectoras para evitar la inflamación crónica y una destrucción progresiva del tejido. Para este propósito, debe ocurrir una inhibición de la síntesis de quimioquinas por acción de agentes locales como el factor de crecimiento transformante (TGF- $\beta$ 1), prostaglandinas o por una combinación específica de mediadores que produzcan la apoptosis de los leucocitos (Segerer S, 2000; Yoshimura A, 2010).

### 2.2.1. Citoquinas, quimioquinas y receptores de citoquinas en el daño renal

Existe un gran número de citoquinas, principalmente quimioquinas proinflamatorias, cuyo comportamiento ha sido estudiado en la enfermedad renal. Por ejemplo, se ha observado una correlación positiva entre los niveles de CCL2/MCP-1 (*Monocyte chemotactic protein-1*) en orina con la proteinuria y el número de macrófagos infiltrados en el riñón en pacientes con enfermedades glomerulares (Rovin BH, 1996). De igual modo, existe una mayor excreción de MCP-1 en pacientes afectados por nefropatía por IgA (Grandaliano G, 1996; Yokoyama H, 1998) y de MCP-1 e IL-8 en los afectados por nefritis lúpica activa (Wada T, 1996).

La síntesis y secreción exacerbada de quimioquinas y citoquinas inflamatorias y de sus receptores es una característica esencial de todos los modelos de daño renal agudo y crónico. La inhibición terapéutica de ambos tipos moleculares mediante antagonismo o ablación genética decrece la inflamación y el daño tisular durante la enfermedad renal.

Estudios de la inhibición funcional, incluyendo tratamiento con anticuerpos bloqueantes de MCP-1 y su receptor CCR2, quimioquinas modificadas químicamente o truncadas (CCL5/RANTES y MCP-1), o pequeñas moléculas antagonistas de receptor, sugieren un papel crítico para estas quimioquinas en la lesión renal. La deficiencia genética de MCP-1 y el bloqueo de su receptor CCR2 protege de la nefropatía diabética (Chow FY, 2006) y la utilización de anticuerpos neutralizantes de MCP-1 redujo la proteinuria, la infiltración de macrófagos y la producción de colágeno observada en nefritis por suero nefrotóxico (Kanamori H, 2007; Lloyd CM, 1997). Además, la deficiencia de CCR2 reduce el daño renal y prolonga la supervivencia de ratones con nefritis lúpica (Pérez de Lema G, 2005). En un modelo de FRA, el bloqueo de la señalización de los receptores CCR1 y CCR2 de leucocitos resulta en la reducción de los macrófagos infiltrados en el intersticio (Furuichi K, 2003; Furuichi K, 2008). Por último se ha descrito que los ratones deficientes en CCL5/RANTES sufren menor glomerulonefritis inducida por autoanticuerpos (Xie C, 2011).

El bloqueo dual de los receptores de quimioquinas CCR5 y CXCR3 también suprime la infiltración de los macrófagos durante el rechazo agudo del injerto renal (Kakuta Y, 2012). En el modelo experimental de nefritis tóxica se observó una reducción de los linfocitos y macrófagos infiltrados y de la proteinuria al bloquear los receptores CC y CXC con un receptor antagonista de origen viral (Chen S, 1998). Interesantemente, en los riñones lesionados de ratones deficientes en CCR1 se ha encontrado una expresión reducida de CCL20/MIP-1 $\alpha$  y de RANTES sugiriendo la existencia de un bucle de retroalimentación positiva para la producción de quimioquinas (Furuichi K, 2003; Furuichi K, 2008). Además, CXCL1, CCL7 y CCL20 reclutan neutrófilos y diferentes subconjuntos de células T hacia el riñón y su inhibición impide

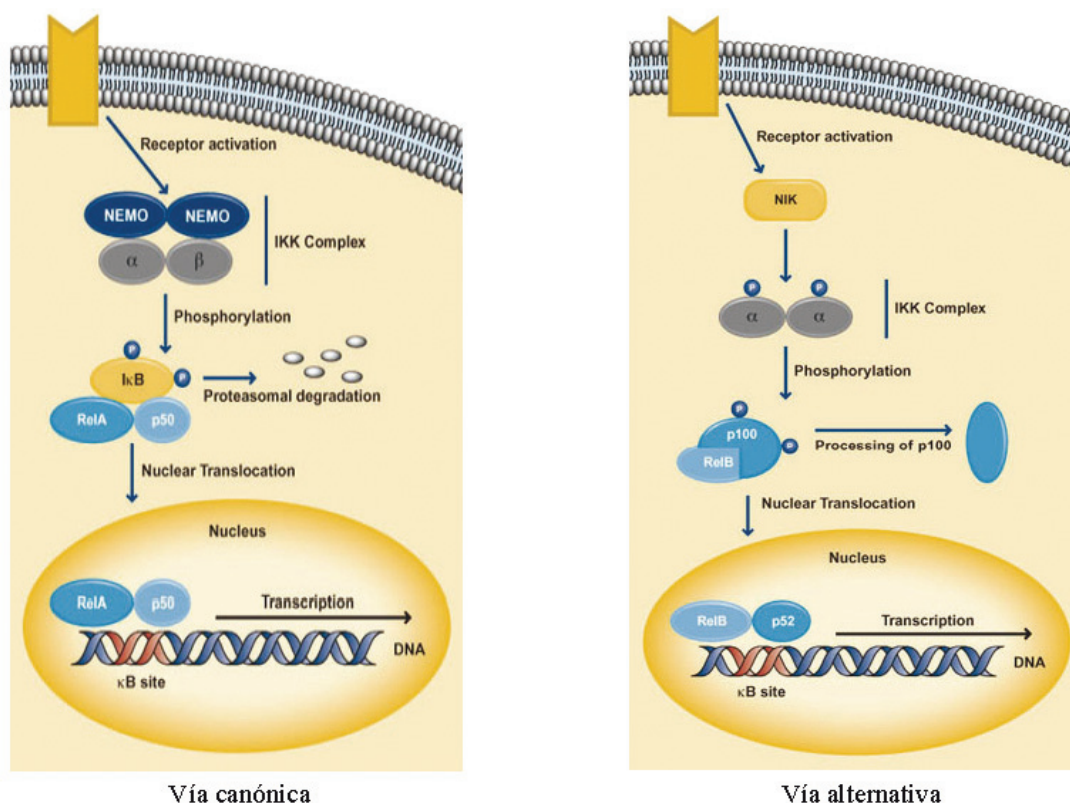
este proceso migratorio y en consecuencia mejora el daño renal (Al-Hamidi A, 2008; Paust HJ, 2012; Roche JK, 2007).

Todos estos estudios confirman que el bloqueo de las quimioquinas resulta en un efecto supresor sobre la infiltración leucocitaria glomerular y la proteinuria en modelos de glomerulonefritis, infiltración tubulointersticial de macrófagos, y el desarrollo de nefropatía diabética (Anders HJ, 2010; Fujinaka H, 1997; Holdsworth SR & Tipping PG, 2007; Kanamori H, 2007; Lloyd CM, 1997; Panzer U, 1999; Schneider A, 1999; Shimizu H, 2003; Tang WW, 1996; Vielhauer V, 2004; Wada T, 2004; Wenzel U, 1997).

### 2.2.2. NF- $\kappa$ B

NF- $\kappa$ B es una familia de factores de transcripción que regulan la transcripción de numerosos genes relacionados con inflamación, inmunidad, apoptosis, proliferación y diferenciación. En mamíferos, se pueden formar 15 factores de transcripción de la familia de NF- $\kappa$ B mediante combinaciones de homo- o heterodímeros de proteínas pertenecientes a la familia Rel (p50/NF- $\kappa$ B1, p52/NF- $\kappa$ B2, RelA/p65, RelB y c-Rel). Estas proteínas comparten el dominio de homología Rel (RHD) en el extremo N-terminal que contiene una secuencia de localización nuclear (NLS) y es responsable de la dimerización y de la unión al ADN. El dominio necesario para la expresión de genes se encuentra únicamente en RelA, RelB y c-Rel.

La activación de NF- $\kappa$ B puede ocurrir a través de las vías canónica, alternativa (no canónica) o por una combinación entre ambas denominada vía híbrida (Figura 3). La vía canónica usualmente se activa rápido, es transitoria y es activada por un amplio rango de estímulos como por ejemplo TNF $\alpha$ , especies reactivas de oxígeno (ROS), IL-1 $\beta$  o lipopolisacáridos (LPS) entre otros (Chandel NS, 2000; Fitzgerald DC, 2007; Qin H, 2005; Renard P, 1997). Se reclutan moléculas IKK que son activadas por fosforilación y estas a su vez fosforilan a I $\kappa$ B $\alpha$ . Esta fosforilación marca a I $\kappa$ B $\alpha$  para degradación liberando al dímero p65/p50 (y otros) que migra al núcleo para actuar como factor de transcripción de sus genes diana entre los que se encuentra I $\kappa$ B $\alpha$  que contribuye a que la respuesta finalice. La vía alternativa posee una activación más lenta e involucra el procesamiento de p100 a p52 tras su fosforilación por IKK $\alpha$ . Esto produce una mayor cantidad de dímeros RelB/p52 libres que pueden emigrar al núcleo para inducir la expresión de los genes diana (Hayden MS & Ghosh S, 2008). Los dímeros resultantes se unen a secuencias discretas del ADN conocidas como  $\kappa$ B que se encuentran en los promotores y en los *enhancers* (Hayden MS & Ghosh S, 2008) e interactúan con una serie de coactivadores (por ejemplo SRC-1, TIF-2, RAC3) o corepresores que regulan la transcripción de los genes diana.



**Figura 3. Diferentes vías de activación de NF-κB.** En el panel de la izquierda se muestra la vía de activación canónica donde la unión ligando/receptor conduce al reclutamiento y activación del complejo IKK compuesto por las subunidades catalíticas IKKα y/o IKKβ y la proteína reguladora NEMO. Este complejo fosforila IκB que marca a la molécula como sustrato de degradación por el proteasoma. Una vez que NF-κB (RelA/p50 u otros) es liberado puede translocarse al núcleo para activar genes diana regulados por sitios κB del ADN. Por otro lado, en el panel de la derecha se puede observar un esquema de la vía de activación de NF-κB alternativa, donde la señalización por receptores desencadena la activación de la quinasa NIK, enzima que fosforila y activa el complejo IKK que a su vez fosforila el dominio IκB de p100 conduciendo a la liberación del dímero RelB/p52. A continuación, este heterodímero se transloca al núcleo donde activará la transcripción de los genes diana regulador por sitios κB del ADN.

Además, las proteínas Rel pueden sufrir modificaciones postraduccionales como fosforilaciones o acetilaciones. Un ejemplo son los 9 sitios descritos donde p65 puede ser fosforilado. Por otro lado, los promotores de NF-κB contienen secuencias consenso para una gran variedad de factores de transcripción que regulan su acción, tanto positivamente como AP-1, STAT3 e IRE1α, o negativamente como CHOP, ATF3 y Nrf2 (Du S, 2009; Fougeray S, 2011; González-Guerrero C, 2013; Jarmin DI, 1994; Li HF, 2010; Nelson PJ, 1996; Nelson PJ & Krensky AM, 1998; Sanz AB, 2010; Yasumoto K, 1992; Zoja C, 2013).

La activación de NF-κB es responsable de la regulación transcripcional de numerosas citoquinas y moléculas de adhesión que son sintetizadas en tipos celulares claves para el daño renal como el epitelio tubular y el endotelio de grandes y pequeños vasos sanguíneos (Caballo C, 2012; Izquierdo MC, 2012; Sanz AB, 2010). Se ha observado que inhibidores farmacológicos de la activación de NF-κB mejoran la función renal en modelos de daño renal experimental. Por

ejemplo, se ha descrito que el partenolide tiene efectos beneficiosos en la glomerulonefritis proliferativa mesangial experimental y disminuye la acumulación de monocitos intersticiales en el daño renal inducido por cisplatino y mediado por Angiotensina II (Ang II) (Francescato HD, 2007; López-Franco O, 2002) y en la inflamación propiciada por TWEAK (Sanz, 2008) y por inhibidores de calcineurina (González-Guerrero C, 2013). Una evidencia más directa de que la inhibición de NF- $\kappa$ B impide la lesión renal se obtuvo a partir del tratamiento de animales sometidos a isquemia-reperfusión, glomerulonefritis, obstrucción ureteral unilateral (UUO) o trasplante renal alogénico, en donde la lesión renal, la infiltración leucocitaria y los mediadores inflamatorios fueron inhibidos por el tratamiento con un señuelo profiláctico de oligodeoxinucleótidos de ADN que contienen la secuencia diana de NF- $\kappa$ B (Cao CC, 2004; Kim KH, 2009; Tomita N, 2000; Vos IH, 2000). Estos estudios, entre muchos otros, ponen en consideración el potencial valor de la inhibición farmacológica de NF- $\kappa$ B como alternativa terapéutica en el daño renal.

### 2.3. Transición epitelio-mesénquima

La transición epitelio mesénquima (TEM) es el proceso de indiferenciación mediante el cual una célula epitelial pierde la impronta epitelial a la vez que adquiere características mesenquimales. La TEM puede inducirse por acción de una gran variedad de estímulos, entre los cuales el TGF- $\beta$ 1 es el prototípico. Esos estímulos, a través de la regulación de distintas vías de señalización y mediadores celulares, inducen una disminución en la expresión de proteínas implicadas en adhesión intercelular como son cadherina-E,  $\beta$ -catenina, ZO-1 (Zonula Occludens-1), claudina y otras. Además, estas células comienzan a sintetizar proteínas típicas de células mesenquimales como vimentina, actina- $\alpha$  del músculo liso ( $\alpha$ -SMA) y fibronectina, entre otras. Durante la TEM, cambios en el patrón de distribución del citoesqueleto de actina son responsables de que la célula epitelial pierda su morfología cuboide y adquiera un fenotipo fibroblastoide con predominancia de estructuras fusiformes y estrelladas. Este cambio morfológico propicia en las células tubulares una mayor movilidad *in vitro* y se especula que una mayor capacidad de migración e invasión en el tejido vivo.

Durante el desarrollo embrionario de vertebrados, tanto la TEM como la transición contraria denominada transición mesenquimal-epitelial (TME) son procesos necesarios para la correcta formación de los tejidos adultos. Por ejemplo, los primeros eventos de TEM se producen durante la implantación del embrión en el útero, la gastrulación y la formación de la cresta neural (Shook D & Keller R, 2003). Betty Hay fue la primera investigadora en acuñar el término TEM en embriología (Hay ED, 1968). Décadas después, la misma autora describió este comportamiento celular durante la migración (Hay ED, 1990) y la importancia de la naturaleza transitoria, y por lo tanto meticulosamente regulada, de este proceso (Hay ED, 1991). La



activación de la TEM en el tejido desarrollado o adulto no es fisiológica y puede ser altamente perjudicial.

La ocurrencia de la TEM es el primer paso de la cascada metastásica durante la progresión tumoral. Las células tumorales pueden sufrir TEM que les confiere un fenotipo migratorio e invasivo aumentando la posibilidad de que ocurra metástasis (Gotzmann J, 2004). La expresión de algunos de los inductores transcripcionales del proceso de TEM, como por ejemplo miembros de la familia de Snail, Twist, ZEB y E-47 entre otros, está silenciada en el tejido adulto, pero puede ser reactivada por distintos estímulos que inducen la perturbación de la homeostasis o el comienzo de procesos patológicos, como se describe más adelante (Boutet A, 2007).

### **2.3.1. Transición epitelio-mesénquima en la patología renal**

Es un hecho que la ocurrencia de la TEM produce pérdida de la integridad epitelial y por lo tanto de funcionalidad de los epitelios renales (Matlin KC & Caplan MJ, 2000; Prozialeck WC & Edwards JR, 2007; Schneeberger EE & Lynch RD, 2004). Asimismo, se propone que la TEM juega un papel en el mantenimiento y progresión de la fibrosis renal por contribuir a la síntesis de matriz extracelular (MEC) (Kalluri R & Neilson EG, 2003; Liu Y, 2004; Zeisberg M & Kalluri R, 2004). Estudios independientes han informado sobre células tubuloepiteliales renales en proceso de TEM en diferentes modelos animales de ERC como por ejemplo, en ratas nefrectomizadas (Ng YY, 1998) o con el síndrome de “Goodpasture” (Okada H, 2001) y en ratones con riñones poliquísticos (Okada H, 2000) o sometidos a UUO (Yang J & Liu Y, 2001). Por otro lado, se han observado células en TEM en biopsias renales humanas de pacientes con diferentes enfermedades renales como por ejemplo glomerulonefritis por IgA, glomeruloesclerosis diabética o nefropatía membranosa entre otras (Rastaldi MP, 2002) y en particular en biopsias de pacientes con glomerulonefritis (Jinde K, 2001). Por último, se ha descrito la aparición de TEM durante el deterioro tardío de riñones humanos transplantados (Vongwiwatana A, 2005).

### **2.3.2. Inductores moleculares de la TEM en el tejido renal**

El mediador más relacionado con los eventos de TEM es la citoquina TGF- $\beta$ 1, que es secretado por los distintos epitelios renales, por los endotelios y por células inmunocompetentes como macrófagos (Docherty NG, 2006; Seoane J, 2006).

El TGF- $\beta$ 1 activo emite señales a través de los receptores de tipo I (TGFR1, ALK5) y de tipo 2 (TGFR2). Tras la unión del ligando, ambos receptores forman un heterodímero que fosforila y activa a las proteínas de la familia Smad. En concreto, las proteínas fosforiladas son las

denominadas Smad 2 y Smad 3 (RSmads) que se encuentran unidas a Smad 4. Las proteínas Smad se localizan de forma mayoritaria en el citoplasma y una vez que son fosforiladas, se acumulan en el núcleo y mediante un módulo de unión a ADN inducen la expresión de distintos genes que median la TEM (Feng XH & Derynck R, 2005; Ten Dijke P & Hill CS, 2004). El TGF- $\beta$ 1 también puede activar rutas independientes de proteínas Smad, como son MAPK (Mitogen-activated protein kinases) y Ras, que también han sido involucradas en la mediación de la TEM (Gotzmann J, 2004; Kalluri R & Neilson EG, 2003). También se ha reportado la producción de TEM en células tubulares mediante activación de proteínas Smad no dependientes de TGF- $\beta$ 1, como es el caso de la inducción de TEM por Ang II (Carvajal G, 2008). El TGF- $\beta$ 1 contribuye a la formación de miofibroblastos activando fibroblastos residentes y por la inducción de TEM o TEM endotelial (EndTEM) (Zeisberg M & Kalluri, R, 2008). En las células epiteliales o endoteliales, el TGF- $\beta$ 1 induce una mayor expresión y activación de represores transcripcionales como Snail y Slug (Boutet A, 2006; Cano A, 2000; Peinado H, 2004; Van Meeteren LA & ten Dijke P, 2012). Se ha propuesto como estrategia terapéutica la inhibición farmacológica de la señalización por TGF- $\beta$ 1 debido a la observación de que dos proteínas represoras de la vía como son HGF y BMP-7 atenúan la fibrosis renal en modelos animales (Liu Y, 2004).

También se han descrito procesos de TEM independientes de la activación y acción de TGF- $\beta$ 1, como por ejemplo la TEM observada por la acción de: oncostatina A (Nightingale J, 2004), productos de glicosilación avanzada (Li JH, 2004), y Ang II (Carvajal G, 2008) y como describimos en este trabajo de tesis, por inhibidores de calcineurina (Berzal S, 2012) y TWEAK (resultados no publicados).

Por último, se ha apuntado que cambios en el microambiente celular tales como alteraciones en los niveles de oxígeno o la activación de la señalización hipóxica a través del factor inducible por hipoxia (HIF) pueden ser disparadores y moduladores de la TEM. Por la gran proximidad entre las secuencias de unión al ADN de HIF y de Smad en genes diana coregulados se ha sugerido que HIF puede colaborar con TGF- $\beta$ 1 en la producción de TEM, mientras que por otro lado el mismo HIF puede inducir vías independientes de TGF- $\beta$ 1 como Notch, HGF y Wnt entre otros (Haase VH, 2009).

### **2.3.3. La familia de factores de transcripción Snail y su regulación**

Snail es un represor transcripcional que regula negativamente la expresión de proteínas implicadas en adhesión como cadherina-E (Cano A, 2000; Peinado H, 2004) y componentes de las uniones estrechas (Claudina-1, ocludina y ZO-1) e indirectamente otras como citoqueratinas o mucina-1. Funciones adicionales sobre el ciclo celular y en la regulación de la polaridad,



supervivencia y migración de células epiteliales también han sido asociadas a la acción de Snail (Barrallo-Gimeno A & Nieto MA, 2005; Moreno-Bueno G, 2008; Vega S, 2004). El papel de la familia Snail ha sido estudiado en profundidad en relación al proceso tumoral como inductores de metástasis (Blanco MJ, 2002; Peinado H, 2004; Peinado H, 2004) y en procesos del desarrollo (Barrallo-Gimeno A & Nieto MA, 2005).

Snail1 ha sido descrito recurrentemente como mediador de la TEM en células renales y su expresión condicional en tejido renal adulto también se asoció a la producción de TEM (Boutet A, 2006; Huang B, 2012; Lange-Sperandio B, 2007; Li Y, 2008; Ohnuki K, 2012; Saad S, 2010; Smith JP, 2009; Yoshino J, 2007). La actividad de Snail está regulada por eventos de fosforilación que determinan su localización subcelular. Las exportinas como CRM1 inactivan Snail favoreciendo su salida del núcleo. La glucógeno sintasa quinasa (GSK3) es una enzima que participa en la regulación postraduccional de Snail mediante fosforilación (Zhou BP, 2004). Se ha descrito que uno de los mecanismos por el cual GSK3 mantiene los niveles de cadherina-E es inhibiendo la actividad de Snail a varios niveles por medio de la regulación de su expresión, degradación y localización (Bachelder RE, 2005). En una célula en reposo, GSK3 se encuentra permanentemente activa favoreciendo la exportación nuclear de Snail mediante fosforilación y posterior degradación proteosomal (Zhou BP, 2004). A su vez, GSK3 está sometido a un circuito de regulación negativa mediante fosforilación, lo que produce su inactivación y por consiguiente el pleno funcionamiento de Snail como regulador de la transcripción (Bachelder RE, 2005).

### **2.3.4. Pérdida del funcionalismo celular por TEM**

La nefrona se compone de una serie de segmentos con características específicas de permeabilidad y polaridad conferidas por la interacción entre complejos proteicos especializados de la membrana citoplásmica y entre estos y la matriz extracelular. Estas estructuras celulares son las denominadas uniones adherentes (“adheren junctions”), uniones estrechas (“tight junctions”), uniones gap, desmosomas y adhesiones focales. En estas estructuras, el andamiaje proteico se encuentra formando una red cuya integridad es vital para mantener las funciones epiteliales básicas, tales como polaridad, permeabilidad y también el correcto número celular y funcionalidad orgánica (Matlin KC & Caplan MJ, 2000; Prozialeck WC & Edwards JR, 2007; Schneeberger EE & Lynch RD, 2004). Durante la inducción de la TEM, la expresión de proteínas de las uniones adherentes, como la cadherina-E y la  $\beta$ -catenina, y de las uniones estrechas, como ZO-1, las ocludinas y las claudinas, se ve reprimida.

Se ha descrito que la pérdida de propiedades adhesivas o TEM del epitelio tubular es clínicamente relevante contribuyendo al rechazo del trasplante renal mediado por lesión renal o

nefrotoxicidad por inhibidores de calcineurina (CNIs) (Hazzan M, 2011, Hertig A, 2010, Wilson PD, 2011). Se propone también que los cambios moleculares de la TEM podrían ser considerados como marcadores pronósticos fiables de pérdida de función renal causada por ciclosporina A (CsA) tras un trasplante renal (Hazzan M, 2011). En la enfermedad renal poliquística, se han observado anormalidades en la estructura de las uniones adherentes y estrechas y en la polaridad, incluyendo pérdida de proteínas como cadherina-E y FAK entre otras (Wilson PD, 2011). Un estudio publicado en 2008, utilizando biopsias renales obtenidas de los pacientes 3 y 12 meses después del trasplante, reportó que la intensidad de la expresión de los marcadores de TEM, como  $\beta$ -catenina y vimentina, correlacionaba con el subsecuente desarrollo de fibrosis intersticial y atrofia tubular (Hertig A, 2010).

### 2.4. Fibrosis renal

El proceso de fibrosis se puede considerar como una cicatrización aberrante y es privativo de la etapa final de la enfermedad renal en modelos animales y en humanos. En el tejido renal se puede producir una pérdida de células tubulares debido a sustancias nefrotóxicas y/o una inflamación crónica del órgano que induce una reparación del tejido. Esta reparación puede tener como consecuencia un desarrollo excesivo de tejido conectivo no funcional que sustituye al epitelio tubular y que por lo tanto provoca la privación de la función renal fisiológica (Meran S & Steadman R, 2011).

Los fibroblastos residentes activados, denominados fibroblastos, constituyen el tipo celular clave del proceso de fibrosis. Estos fibroblastos tienen la capacidad de expresar proteínas mesenquimales como vimentina y  $\alpha$ SMA y son productores de colágenos que forman la MEC. En modelos experimentales y en enfermedades renales humanas, su presencia se usa como predictor de progresión fibrótica (Meran S & Steadman R, 2011).

#### 2.4.1. Participación de la TEM en la fibrosis renal

En la patología renal, los fibroblastos residentes se activan y diferencian a miofibroblastos bajo la influencia de factores de crecimiento, citoquinas y hormonas. La principal característica de este tipo celular es la síntesis de MEC y por lo tanto estas células son fundamentales en procesos reparativos y de cicatrización. Entre esos factores se encuentran moléculas como TGF- $\beta$ 1, CTGF, FGF, PDGF, IL-1, TNF $\alpha$ , Ang II y aldosterona (Meran S & Steadman R, 2011). Alternativamente, otros tipos celulares pueden diferenciarse a miofibroblastos, como por ejemplo las células circulantes originadas en la médula ósea, los fibrocitos, los fibroblastos perivasculares y los pericitos (Bucala R, 1994; Lin SL, 2008; Wada T, 2007). Además, se ha propuesto que otra fuente de miofibroblastos pueden ser las células del epitelio tubular o células endoteliales a través de la TEM o de la TEM endotelial (TEMend) y que el TGF- $\beta$ 1 estaría

implicado en ambos procesos (Liu Y, 2010; Zeisberg M & Kalluri R, 2008). En un trabajo reciente, el origen y funcionalidad de los miofibroblastos fue abordado a través de múltiples aproximaciones metodológicas, incluyendo ratones manipulados por ingeniería genética para realizar el seguimiento y eliminación de poblaciones celulares específicas. En este estudio se determinó que el 50% de los miofibroblastos provienen de la proliferación de fibroblastos residentes en el tejido renal, un 35% se originan por diferenciación desde médula ósea y el 15% restante tienen como fuente a las células endoteliales y epiteliales a través de procesos de EndTEM (10%) y de TEM (5%) respectivamente (LeBleu VS, 2013). Los podocitos también sufren una conversión fenotípica, caracterizada por la pérdida de marcadores específicos y por la adquisición de características reminiscentes de la TEM tubular (Lee HS, 2012; Li Y, 2008).

### **3. Moléculas exógenas y endógenas que contribuyen al daño renal**

Los agentes nefrotóxicos exógenos, como drogas o venenos, pueden lesionar el tejido renal de forma directa y producir alteraciones en la funcionalidad celular que desencadenan respuestas bioquímicas adaptativas. Entre ellas se cuentan las respuestas frente a hipoxia, estrés celular y la activación de mecanismos de la inmunidad innata. La activación de numerosas vías de señalización y la síntesis y liberación no controlada de multitud de mediadores endógenos causan el daño agudo y crónico por agentes nefrotóxicos exógenos. Muchos de estos mediadores endógenos del daño renal también se activan o liberan como consecuencia de procesos patológicos que afectan en forma primaria o subyacente al riñón produciendo daño agudo o crónico.

Los inhibidores de calcineurina son xenobióticos que pueden producir un deterioro en la función renal mediante el disparo de diversos mecanismos patológicos que incluyen la pérdida funcional o física del tejido renal por muerte celular, inflamación y fibrosis (Naesens M, 2009). Estos mismos procesos son también inducidos por numerosos factores endógenos, especialmente citoquinas, factores de crecimiento y genes de respuesta a estrés celular, que actúan en el FRA y en la ERC con componente metabólico como la diabetes, genético como la fibrosis quística o autoinmune como la nefropatía por deposición glomerular de IgA. Entre estos factores, el rol de TWEAK como mediador del daño renal está siendo estudiado activamente en modelos animales y ensayos clínicos (Ortiz A, 2011; Sanz AB, 2011; Ruiz-Ortega M, 2014).

### 3.1. Inhibidores de calcineurina

Los inhibidores de calcineurina son ampliamente usados como inmunosupresores.

#### 3.1.1. Función de la calcineurina y los efectos de su inhibición

En los linfocitos T, la fosfatasa calcineurina activa el factor nuclear del linfocito T activado (NFAT) y es responsable de la transcripción de la IL-2 que, a su vez, estimula el crecimiento y diferenciación de los linfocitos T (Yamashita M, 2000). De este modo, la inhibición de la actividad de la calcineurina reduce la función de las células T efectoras y produce inmunosupresión. El uso de los CNIs en clínica ha permitido una mejoría decisiva a corto y medio plazo, tanto en las tasas de rechazo como en la supervivencia del injerto, en todos los trasplantes de órganos, incluido el renal. Sin embargo, sus efectos nefrotóxicos limitan su utilidad a largo plazo. Los principales efectos negativos de los CNIs sobre el riñón son la vasoconstricción que media la caída aguda de función renal, y la pérdida de la función celular por apoptosis, inflamación y fibrosis que resulta en un deterioro crónico de la función renal (Naesens M, 2009). Los CNIs más conocidos, estudiados y utilizados en clínica son la CsA y el Tacrolimus.

#### 3.1.2. Ciclosporina A

La CsA es un péptido no ribosomal cíclico de 11 aminoácidos que es producido por el hongo *Tolypocladium inflatum* y que se une en las células diana a la ciclofilina formando un complejo que inhibe la actividad de la fosfatasa calcineurina (Clipstone NA & Crabtree GR, 1992). La CsA es un inmunosupresor muy utilizado para evitar el rechazo del trasplante alogénico (Kronke M, 1984). También es utilizada para tratar enfermedades autoinmunes como la psoriasis y la artritis reumatoide (Vercauteren SB, 1998).

La introducción de la CsA en la clínica supuso un gran avance en el área del trasplante renal, donde permitió mejorar ostensiblemente las tasas de supervivencia del injerto durante el periodo inicial. Sin embargo, el uso crónico adolece de la limitación de estar afectado por diversos efectos secundarios adversos, entre los cuales el más importante es la nefrotoxicidad (Bennet WM, 1995), componente importante de la enfermedad crónica del injerto. El principal efecto perjudicial agudo de la CsA sobre el riñón es una reducción en el flujo sanguíneo renal y en la tasa de filtración glomerular, daño que es reversible con la disminución de las dosis de fármaco (Remuzzi G & Perico N, 1995). El tratamiento crónico con CsA puede ser causal de la pérdida del injerto debido a la merma total de la función renal (Myers BD, 1984). Histológicamente, la lesión crónica por CsA está caracterizada por la presencia de glomeruloesclerosis, atrofia tubular y fibrosis intersticial (Naesens M, 2009). Los mecanismos del daño renal por CsA han sido abordados a través de numerosas investigaciones utilizando diversos modelos celulares y

animales desarrollados en ratas, ratones y cerdos, en conjunto con análisis genómicos y proteómicos.

La CsA induce apoptosis de células del túbulo renal (Bakker RC, 2002; Justo P, 2003; Ortiz A, 1998) mediante el aumento de la expresión de Fas/FasL, la activación de la vía intrínseca caracterizada por el descenso de la expresión de Bcl-2 y Bcl-xL, la inducción de estrés oxidativo y la inhibición de la síntesis de NO. Otros mediadores incluyen la síntesis de genes de respuesta a estrés del retículo endoplásmico como HERP, HRP78 y CHOP y la implicación de reguladores del ciclo celular como p53. La CsA también provoca apoptosis mediante pérdida del equilibrio hidroelectrolítico e hipertonicidad y mediante mecanismos que implican la señalización por el receptor tipo I de Ang II (Xiao Z, 2011; Xiao Z, 2013).

Asimismo, la CsA induce procesos de inflamación en tejido renal como la aparición de infiltrado celular intersticial en un modelo de nefrotoxicidad por CsA (Gillum DM, 1990). Un trabajo reciente de nuestro grupo demuestra que la CsA activa las quinasas JAK2, JNK y TAK-1, la señalización por TLR4 y la activación de la UPR (*Unfolding Protein Response*) para activar NF- $\kappa$ B e inducir una respuesta inflamatoria en el túbulo renal (González-Guerrero C, 2013).

Además, las células tubulares expuestas a CsA pueden sufrir TEM y desarrollar un fenotipo miofibroblástico (Slattery C, 2005). La CsA regula también la permeabilidad paracelular y la resistencia transepitelial modulando la expresión de proteínas clave de las uniones estrechas (Feldman G, 2007; Lee CH, 2011). Se ha propuesto que la CsA produce su efecto tóxico por inducción de TEM debido a un aumento en la expresión de TGF- $\beta$ 1 (Feldman G, 2007; Slattery C, 2005). El bloqueo de la acción de TGF- $\beta$ 1 evita la mayor expresión de componentes de la MEC inducida por el tratamiento con CsA (Ling H, 2003). Por otro lado, se ha descrito en ratas que la inhibición de la acción de Ang II modera la caída de función inducida por CsA (Ishikawa A, 1997). Además, otros mecanismos o mediadores de TEM por CsA han sido reportados, entre ellos se encuentran Nox2 (Djamali A, 2012), JNK (Pallet N, 2012), el sistema Nrf2-HO-1 (Shin DH, 2010), CTGF (Xu Y, 2010) y las proteínas E2A (Slattery C, 2006).

### 3.1.3. Tacrolimus

El tacrolimus, también conocido como FK-506, es un inmunosupresor clínico de uso habitual en el tratamiento del rechazo del trasplante. Además, también es usado para tratar la dermatitis severa, la uveítis refractaria tras trasplantes de médula ósea y el vitíligo. Su estructura es la de un macrólido con un anillo de lactona de 23 miembros y fue aislado de la bacteria *Streptomyces tsukubaensis*. El mecanismo de inhibición de la calcineurina es similar al observado en CsA

(Naesens M, 2009) aunque el tacrolimus forma un complejo con una proteína distinta a la ciclofilina A, la inmunofilina FKBP12. El empleo de tacrolimus como inmunosupresor también causa nefrotoxicidad (Katari SR, 1997) pero se han observado diferencias con respecto al tratamiento con CsA.

Se ha observado que la eficiencia en la prevención del rechazo crónico para el tacrolimus es similar a la descrita para CsA, sin embargo, algunos estudios han demostrado que la incidencia de rechazo agudo es menor al usar tacrolimus (Webster AC, 2005). De igual modo, un estudio de proteómica ha descrito que sobre células renales humanas el tacrolimus induce un menor número de variaciones en la expresión de proteínas que la CsA (Lamoureux F, 2011) y otro aporta que tacrolimus podría ser menos nefrotóxico pero que induciría mayor diabetes mellitus tras el trasplante (Martins L, 2004).

El tacrolimus induce nefrotoxicidad en ratas que es inhibida por un bloqueante de los canales de calcio a nivel muscular, el Diltiazem (Chen YH, 2007) y por polifenoles de plantas que son “barredores” de radicales libres producidos por tacrolimus (Zhong Z, 2006). Además, en otro modelo en ratas, tacrolimus induce la expresión de TGF- $\beta$ 1 y de las subunidades de la NADPH oxidasa y reprime la expresión de genes antioxidantes (Khanna AK & Pieper GM, 2007). También en ratas tratadas con tacrolimus, se ha reportado que al inhibir el sistema renina-angiotensina se reduce la expresión de citoquinas fibrogénicas (Deniz H, 2006). Por otro lado, se ha visto que el tratamiento con tacrolimus induce apoptosis de células del túbulo proximal renal (Hortelano S, 2000). Por último, recientemente nuestro laboratorio ha informado sobre mecanismos que desencadena tacrolimus para inducir inflamación en células tubulares que son similares a los usados por CsA (González-Guerrero C, 2013).

Los diferentes estudios sobre toxicidad renal llevados a cabo con tacrolimus en comparación con los realizados con CsA detallando la ubicación de la lesión renal, el proceso patológico, el mecanismo por el que se produce este y el modelo experimental donde se ha comprobado se recopilan en la Tabla 1.

Lesión renal	Procesos patológicos	Mecanismos	Modelo experimental	Estímulos
Vascular/endotelial	<ul style="list-style-type: none"> <li>Hipertensión</li> <li>Vasoconstricción</li> <li>Vasodilatación</li> <li>Hialinización</li> <li>Microangiopatía trombótica</li> </ul>	Síntesis de endotelina	Cs epiteliales renales cerdo	CsA
			Rata	
			Biopsias renales	CsA Tacrolimus
		Activación sistema Renina/AngII	Cs yuxttaglomerulares corteza renal rata	CsA
			Rata	
			Biopsias renales	
		Represión de COX-2	Rata	CsA Tacrolimus
		Inhibición síntesis NO	Cs epiteliales renales de cerdo	CsA Tacrolimus
			Cs endoteliales vaca	CsA
			Rata	
		Depósito de Hialina	Rata	CsA
Tubulointerstitial	Apoptosis	Disfunción mitocondrial	Rata	CsA Tacrolimus
		Acumulación de p53	Cs epiteliales renales de cerdo	CsA
		Síntesis de radicales libres y/o ROS	Rata	
	TEM/Fibrosis	Síntesis de TGF- $\beta$ 1	Cs epiteliales renales ratón/perro/humano	CsA
			Rata	CsA Tacrolimus
			Biopsias renales	
		Activación sistema Renina/AngII	Rata	CsA Tacrolimus
	Pérdida de uniones celulares	Activación de JNK	Cs epiteliales renales humano	CsA
		Inhibición de cotransporte Na <sup>(+)</sup> Cl <sup>-</sup>	Cs epiteliales renales perro	
			Rata	
		-	Cs epiteliales renales perro/cerdo	
	Inflamación	Infiltrado macrófagos/linfocitos	Rata	CsA
		Activación NF- $\kappa$ B y síntesis de citoquinas proinflamatorias	Cs epiteliales renales ratón	CsA Tacrolimus
			Ratón	CsA
	Trastornos electrolíticos	Hiperpotasemia	Cs epiteliales renales perro	CsA Tacrolimus
			Rata	
			Biopsias renales	
		Descenso del transporte de Mg	Rata	CsA
			Biopsias renales	
		Calcificación	Cs epiteliales renales	CsA Tacrolimus
			Rata	
			Biopsias renales	
Glomerular	Glomerulosclerosis/Proteinuria	Hialinosis arteriolar	Biopsias renales	CsA Tacrolimus
		Arteriopatía		
		Isquemia glomerular		

**Tabla 1.** Comparativa entre los estudios sobre nefrotoxicidad realizados con CsA y los realizados con Tacrolimus

### 3.2. TWEAK

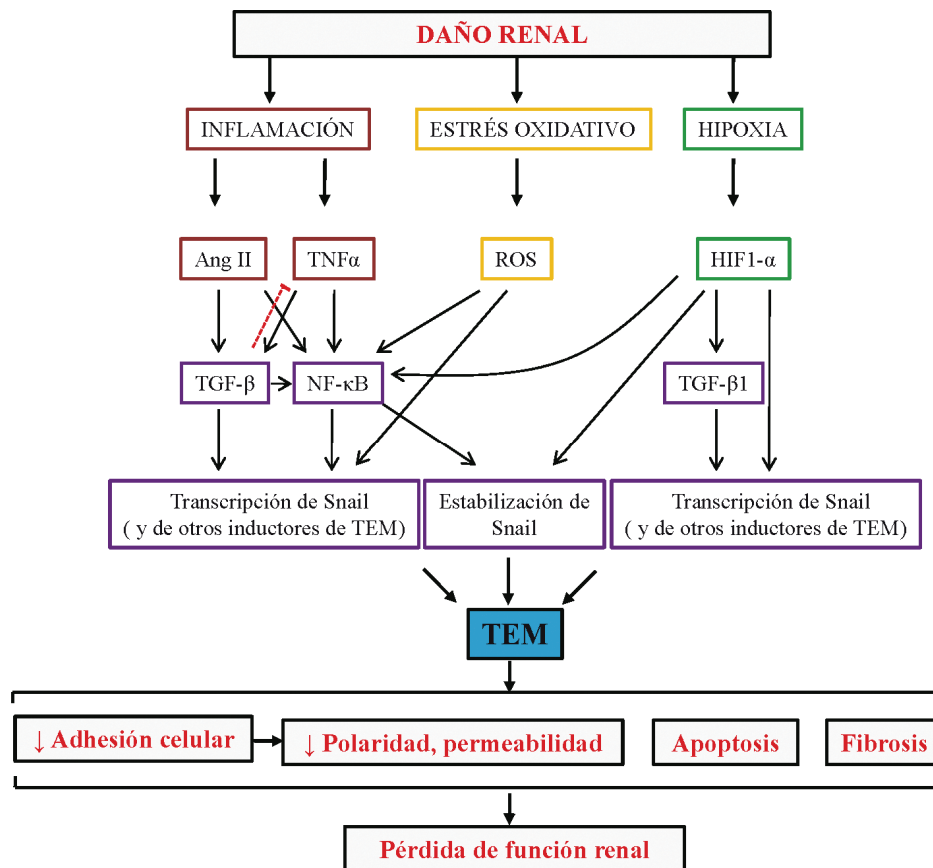
Trabajos realizados en nuestro laboratorio han establecido que la citoquina de la superfamilia del TNF denominada TWEAK (*tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis*) regula procesos con una potencial relevancia fisiopatológica para la lesión renal como la muerte celular, la inflamación, y la proliferación del tejido renal a través de su receptor Fn14 (Justo P, 2006; Ortiz A, 2011; Sanz AB, 2009, Sanz AB, 2011). Tanto TWEAK como Fn14 son expresados por células renales tubulares y glomerulares. Las fuentes potenciales de la presencia de TWEAK en el riñón son los monocitos infiltrados, los linfocitos T y las células renales tubulares y mesangiales. Las células mesangiales, tubulares y los podocitos de origen humano o murino expresan Fn14 y son capaces de responder a TWEAK (Sánchez-Niño MD, 2013). La interacción de TWEAK con Fn14 en células renales ha sido relacionada con la patogénesis del FRA y de la ERC, con el daño glomerular y tubulointersticial y con la enfermedad renal inmune o no inmune. En células tubulares, TWEAK induce proliferación, activa NF- $\kappa$ B por las vías canónica y alternativa, promueve la síntesis de mediadores inflamatorios y, en presencia de TNF $\alpha$  e interferón  $\gamma$  (INF $\gamma$ ), es capaz de disparar la apoptosis (Campbell S, 2004; Han S, 2003; Justo P, 2006; Sanz AB, 2008; Sanz AB, 2009; Sanz AB, 2010). Se ha descrito que el tratamiento profiláctico con anticuerpos anti-TWEAK modera la inflamación y las tasas de apoptosis y proliferación observadas durante el FRA (Sanz AB, 2008; Sanz AB, 2009). Por otro lado, otro estudio ha mostrado que los ratones KO para TWEAK están protegidos frente a la fibrosis renal inducida en un modelo experimental de UUO. Estos animales presentaron una menor acumulación de MEC y esto ha sido relacionado con un descenso en la proliferación de miofibroblastos (Ucero AC, 2013). La utilización de anticuerpos neutralizantes de TWEAK, que están siendo testados en ensayos clínicos de nefritis lúpica (<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01499355>, accessed June 29, 2013), remarca la potencial importancia del bloqueo de las acciones de esta citoquina como terapia farmacológica de la enfermedad renal aguda y crónica.

### 4. Relaciones entre inflamación y TEM/Fibrosis renal: Papel de NF- $\kappa$ B

Aunque la inflamación ha sido asociada con la progresión de la ERC durante décadas, los mecanismos moleculares implicados han permanecido sin dilucidar hasta recientemente (Cordon-Cardo C & Prives C, 1999; Kalluri R & Neilson EG, 2003; Mantovani A, 2008). La TEM ha sido propuesta como uno de los eventos centrales que enlazan la inflamación con las enfermedades fibróticas degenerativas. La obstrucción aguda de uno de los uréteres, que simula los diferentes estadios de la enfermedad renal obstructiva, es el modelo experimental de elección para el estudio de la fibrosis tubulointersticial. En este modelo se ha demostrado que la ocurrencia de inflamación es clave para la progresión del daño hacia la fibrosis (Esteban V,



2004; Miyajima A, 2003, Ucero AC, 2013). En este contexto, la expresión de TGF- $\beta$ 1 inducida por Ang II o su secreción por los macrófagos infiltrantes y por las propias células renales juega un papel central en la inducción de la TEM y la fibrosis (Carvajal G, 2008; Feng XH & Derynck R, 2005; Gotzmann J, 2004; Kalluri R & Neilson EG, 2003; Ten Dijke P & Hill CS, 2004; Zeisberg M & Kalluri, R, 2008). El TNF $\alpha$  es un elemento central en la respuesta inflamatoria renal a través de la activación de NF- $\kappa$ B. Diferentes estudios señalan la capacidad del TNF $\alpha$  como impulsor de la TEM a través de la inducción de la actividad promotora de Snail y de su estabilización (Dong R, 2007; Wu Y, 2009).



**Figura 4. Procesos fisiopatológicos y mediadores moleculares que contribuyen al daño renal inflamatorio y su relación con la inducción de la TEM.** Diversos mediadores del daño renal, como TNF $\alpha$ , Ang II, ROS e hipoxia convergen en la inducción de NF- $\kappa$ B, una de las principales rutas inflamatorias renales. El TGF- $\beta$ 1 primariamente controla la respuesta inflamatoria, actuando por el contrario como un potente agente fibrogénico cuando el estado inflamatorio es persistente. TGF- $\beta$ 1, NF- $\kappa$ B y la hipoxia juegan un papel crucial en la activación de Snail, y de otros represores transcripcionales inductores de TEM, ya sea por mecanismos activos (inducción de la transcripción) o bien pasivos (incremento de la estabilidad). La TEM causa la pérdida de propiedades epiteliales que redunda en una menor adhesión celular y en células con menor grado de diferenciación y funcionalidad. También puede ser causal de pérdida del número de células funcionales por apoptosis y reemplazo del tejido funcional por fibrosis. En definitiva, estos cambios impactan negativamente sobre la función renal (modificado de López-Novoa JM & Nieto MA, 2009).

Varios estudios demuestran que NF- $\kappa$ B puede también activar la transcripción de potentes inductores de TEM, incluyendo Snail y ZEB. En uno de ellos, la inhibición química de GSK3

impidió la transcripción de Snail en forma dependiente de la inhibición de NF- $\kappa$ B (Bachelder RE, 2005). También, con experimentos de transcripción diferencial se ha descrito que NF- $\kappa$ B estimula la transcripción de Snail a través de una región localizada inmediatamente posterior al mínimo promotor (Barberá MJ, 2004). Por otro lado, se ha descrito que células con el p65 constitutivamente activo presentan menor expresión de cadherina-E y a su vez mayor expresión de vimentina, proponiendo como mediadores de ello a ZEB1 y ZEB2 (Chua HL, 2007). En la misma línea existe un trabajo en células tumorales donde se observó que la activación de NF- $\kappa$ B mediada por Akt, induce una mayor expresión de Snail y posterior represión de cadherina-E y, además, que la expresión de la subunidad p65 es suficiente para la inducción de TEM (Julien S, 2007). Finalmente, el bloqueo de la actividad de NF- $\kappa$ B en células epiteliales sobreexpresando IGF-IR (*Type I insulin-like growth factor receptor*) evita la TEM observada previamente (Kim HJ, 2007). Estas interrelaciones entre inflamación y TEM/fibrosis renal se resumen en la Figura 4.

## 5. Nanomedicinas

Actualmente, el desarrollo de nuevas terapias farmacológicas se aborda desde diferentes aproximaciones. Por un lado, la investigación en genómica y proteómica permite la identificación de nuevas dianas moleculares de potencial interés farmacológico (Atkins JH & Gershell LJ, 2002). A su vez, se trabaja activamente en el diseño de sistemas innovadores de transporte desarrollados para dirigir al agente bioactivo de forma más precisa a las células o tejido objetivo (Huang PS & Oliff A, 2001; Moses MA, 2003). Esta liberación del fármaco en el área dañada o enferma es crucial para maximizar el potencial terapéutico de un agente bioactivo (Vicent MJ & Pérez-Payá E, 2006).

La nanociencia y la nanotecnología son las áreas del conocimiento que ofrecen innovaciones técnicas en la administración de fármacos (Vicent MJ & Pérez-Payá E, 2006) y cuya aplicación puede redundar en la obtención de nanomedicinas con las características de selectividad requeridas en tratamientos orientados a dianas celulares o moleculares específicas.

### 5.1. Polímeros terapéuticos

Los polímeros terapéuticos constituyen uno de los primeros desarrollos en el área de las nanomedicinas. Estas nuevas entidades químicas son constructos nanométricos híbridos que combinan covalentemente un agente bioactivo con un polímero que asegura no sólo una eficiente liberación en el compartimento intracelular requerido sino también su disponibilidad en un período específico de tiempo (Duncan R, 2003). El término “polímeros terapéuticos” engloba cinco grupos de nanoconstrucciones híbridas que utilizan polímeros hidrosolubles, los

que pueden demostrar por sí mismos bioactividad, como así también formar parte de complejos multicomponentes haciendo las veces de transportador de un agente terapéutico. Estas nanoconstrucciones incluyen: fármacos poliméricos con actividad inherente (Donaruma LG & Razzano J, 1966; Seymour LW, 1991), micelas poliméricas, poliplejos con aplicación como vectores no virales en transporte génico (Pack DW, 2005; Wagner E & Kloeckner J, 2005), conjugados polímero-fármaco (Duncan R, 1992; Duncan R, 2003) y conjugados polímero-proteína (Duncan R, 2003; Harris JM & Chess RB, 2003).

## **5.2. Utilización de conjugados poliméricos inhibidores del apoptosoma como modelo de nanomedicinas de potencial uso clínico**

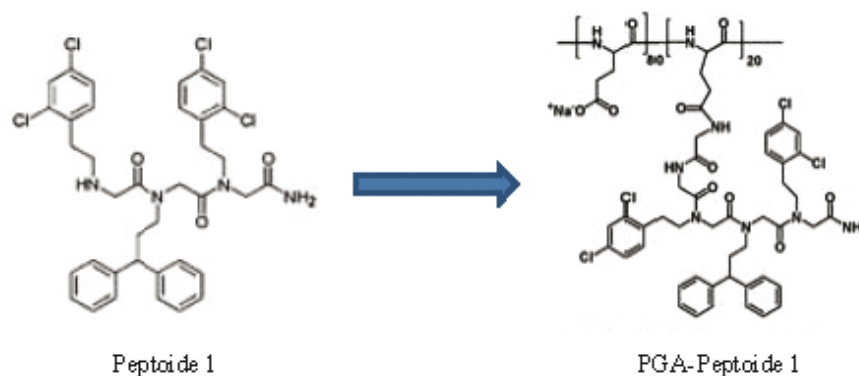
Según el modelo de Ringsdorf (Ringsdorf H, 1975), los conjugados polímero-fármaco están caracterizados por un portador polimérico biocompatible y una o varias moléculas biológicamente activas de bajo peso molecular, que se encuentran unidas de forma covalente al polímero a través de un “linker”. En la mayoría de casos, la presencia del polímero aumenta la solubilidad de la droga hidrofóbica (Meerum Terwogt JM, 2001) y mejora su perfil farmacocinético incrementando su vida media plasmática, aumentando el volumen de distribución y reduciendo su eliminación por el hígado y el riñón (Vasey PA, 1999). El polímero también protege a la droga frente a la degradación enzimática (Yurkovetskiy AV & Fram RJ, 2009). El “linker” no solo mantiene la unión polímero-fármaco sino que también es un elemento activo en la biodisponibilidad del fármaco, al permitir la liberación de este por cambios de pH o mediante escisión por esterasas, lipasas o proteinasas (Brocchini S & Duncan R, 1999; Duncan R, 1983). Hasta la fecha, únicamente polímeros lineales, tanto naturales [ácido poli-L-glutámico (PGA) y dextranos] como sintéticos (polietilenglicol y N-2-hidroxipropilmetacrilamida), han logrado llegar a fase clínica (Duncan R, 2003).

El apoptosoma es un complejo multiproteico formado por Apaf-1, el citocromo C y la procaspasa-9, que sirve como plataforma de activación de esta última y que por consiguiente media la apoptosis por vía mitocondrial (Li P, 1997). Estudios recientes han propuesto al apoptosoma como una estructura importante para el desarrollo de inhibidores de la apoptosis (Vicent MJ & Pérez-Payá E, 2006; Malet G, 2006).

El peptóide 1 es el primer compuesto con capacidad para interactuar con Apaf-1 surgido de una librería de peptoides (trímeros de N-alkil-glicinas) bioactivos (Humet M, 2003). La unión del peptóide 1 a PGA origina el QM56, un conjugado polimérico inhibidor de Apaf-1 de primera generación (Vicent MJ & Pérez-Payá E, 2006) (Figura 5). QM56 interfiere con la unión de los dominios CARD presentes en Apaf-1 y en la procaspasa-9 por interacción directa con estos dominios (Acehan D, 2002; Malet G, 2006). Ha sido demostrado que QM56 previene la

muerte celular inducida por drogas antitumorales y protege a cardiomiocitos cultivados de la muerte producida por hipoxia (Mondragón L, 2008). Además, QM56 protege a las células mesoteliales en cultivo de la muerte celular ocasionado por citoquinas y toxinas y favorece la remesotelización en un modelo murino de daño peritoneal inflamatorio por *S. aureus* (Santamaría B, 2009).

El peptóide componente de QM56 posee una alta flexibilidad que puede dar lugar a reacciones “off target” con la consiguiente pérdida de especificidad. Modificaciones sucesivas en la estructura de este peptóide han logrado una mayor rigidificación de su estructura y una interacción más específica con Apaf-1 (Corredor M, 2013; Mondragón L, 2009). La utilización de estas estructuras podría también mejorar el potencial uso clínico de los conjugados poliméricos.



**Figura 5.** Conjugación del peptóide 1 con el ácido poliglutámico (PGA) para formar el nanoconjugado polimérico QM56.

En resumen, a pesar de los avances en el conocimiento de la patogenia de las enfermedades renales todavía no disponemos de tratamientos eficaces que permitan tratar el FRA o evitar la progresión a fibrosis renal de las enfermedades renales, crónicas o agudas cronicadas. Con frecuencia, en las enfermedades renales o multifactoriales, causadas o agravadas por la coexistencia de varias etiologías resulta de interés buscar posibles dianas terapéuticas que participen en la lesión desencadenada por varios agentes etiológicos, especialmente las que puedan regular simultáneamente los principales procesos celulares implicados en el daño renal: muerte celular, inflamación y fibrosis o diferenciación epitelio-mesenquimal. Las vías de señalización intracelular y los factores de transcripción tienen el potencial para actuar a varios de estos niveles. Por ello, en la presente tesis hemos explorado los mecanismos moleculares de la lesión de las células tubulares renales desencadenados por toxinas exógenas y moléculas lesivas endógenas, centrándonos en la transducción intracelular de señales y los factores de transcripción activados, buscando aproximaciones terapéuticas que nos permitieran modular

varias de estas señales para evitar efectos letales, proinflamatorios y/o profibróticos. Entre los posibles agentes terapéuticos nos hemos centrado en las nanomedicinas, que tienen el potencial para favorecer la selectividad de su acción en ciertas estirpes celulares de interés.





*Objetivos*





### **Hipótesis y objetivos:**

Nuestra hipótesis es que un mejor conocimiento de los mecanismos moleculares de la lesión de la célula tubular renal pudiera ayudar a identificar nuevas dianas terapéuticas que permitan tratar el fracaso renal agudo y enlentecer la progresión de la enfermedad renal crónica.

El objetivo general de esta tesis doctoral consiste en identificar nuevas vías moleculares de nefrotoxicidad por inhibidores de calcineurina y citoquinas proinflamatorias y experimentar aproximaciones terapéuticas que permitan proteger al riñón de los efectos deletéreos de estos agentes.

Los objetivos específicos fueron:

1. Caracterizar los mecanismos moleculares de la lesión de células tubulares renales por inhibidores de calcineurina.
2. Caracterizar los mecanismos moleculares de la lesión de células tubulares renales por TWEAK.
3. Identificar nuevas aproximaciones terapéuticas que proporcionen nefroprotección basadas en el empleo de nanomedicinas experimentales.





*Materiales y Métodos*



## Cultivos celulares

### Células MCT

Línea celular procedente de células epiteliales del túbulo renal proximal de ratón aisladas por primera vez por Eric Neilson (Universidad de Vanderbilt, Nashville, TN) y que han sido ampliamente caracterizadas (Haverty TP, 1988). Estas células fueron crecidas en medio RPMI-1640 suplementado con suero bovino fetal de complementado (DFBS, 10%), glutamina (2 mM), penicilina (100 U/ml) y estreptomycin (10 mg/ml).

### Células HK2

Línea celular comercial procedente de células epiteliales del túbulo renal proximal humano (ATCC, Rockville, MD). El medio de cultivo utilizado para crecer estas células fue el mismo que el utilizado para las células MCT añadiendo además ITS (Insulina/Transferrina/Selenio, 100 µg/ml) e hidrocortisona (5 ng/ml).

### Células MEF-Apaf<sup>-/-</sup> y MEF-Apaf<sup>+/+</sup>

Fibroblastos de embriones homocigotos procedentes de ratones deficientes para Apaf-1 (MEF-Apaf<sup>-/-</sup>) o procedentes de ratones *wild-type* (MEF-Apaf<sup>+/+</sup>) (Cecconi F, 1998) que fueron generosamente cedidos por el Profesor Francesco Cecconi (Departamento de Biología de la Universidad “Tor Vergata” de Roma, Italia). Estos fibroblastos se cultivaron en medio DMEM con los mismos suplementos añadidos al medio RPMI utilizado para cultivar células MCT.

## Protocolo experimental general

Se siembra un número similar de células en cada placa o pocillo necesario para el experimento y se incuban en su medio de crecimiento (con DFBS al 10%) correspondiente, a 37°C y con 5% de CO<sub>2</sub> hasta que el cultivo alcanza un 60-80% de confluencia. En ese momento se retira ese medio, se lavan las células con suero fisiológico estéril y se añade medio sin DFBS para provocar una parada del ciclo celular en todas las células del cultivo. Tras 16-24 horas de espera se recambia el medio sin suero y se añaden los estímulos (Tabla 2). En caso de ensayos en presencia de inhibidores (Tabla 3), primero incorporamos estos al medio de depleción y 60 minutos más tarde se añaden los estímulos correspondientes. En ningún caso los inhibidores son retirados del medio, sino que permanecen junto al estímulo durante todo el experimento.

Nombre	[final]	Vehículo
Ácido fólico	250 mg/Kg	0,3 M bicarbonato sódico
Ciclosporina A	10-40 µg/mL	Etanol
INF $\gamma$	30 U/mL	H <sub>2</sub> Od
LPS	1 µg/mL	H <sub>2</sub> Od
Paricalcitol	50 ng/ml	Etanol,propilenglicol y H <sub>2</sub> Od
Tacrolimus	20 µg/mL	Etanol
TGF- $\beta$ 1	10 µM	H <sub>2</sub> Od
TNF $\alpha$	30 ng/mL	H <sub>2</sub> Od
TWEAK	100 ng/mL	Fosfato sódico y RPMI (5% DFBS)

**Tabla 2.** Estímulos utilizados especificando la concentración final *in vitro* o *in vivo* y su vehículo.

Nombre	[final]	Acción sobre	Vehículo
Cloruro de Litio	30 mM	GSK3 $\alpha$ & $\beta$	H <sub>2</sub> Od
Ac bloq. TGF $\beta$ 1	1 µg/mL	TGF- $\beta$ 1	H <sub>2</sub> Od
AG490	50 µM	JAK2	DMSO
Bay 11-7082	1 µM	Fosforilación de I $\kappa$ B $\alpha$	DMSO
Cicloheximida	10 µM	Síntesis de proteínas	DMSO
ITEM-4	2,5 µg/mL	Fn14	H <sub>2</sub> Od
Jasplakinolide	50 nM	Despolimerización de actina	DMSO
Lactacistina	10 µM	Proteasoma (20 S)	DMSO
Partenolide	10 µM	NF- $\kappa$ B	DMSO
PD98059	20 µM	Activación de ERK	DMSO
QM56	20 nM	Apaf-1	PBS
SB418256	30 µM	GSK3 $\alpha$ & $\beta$	DMSO
SB421543	10 µM	Receptor ALK5 de TGF- $\beta$ 1	DMSO
z-DEVD-fmk	100 µM	Caspasa 3	DMSO
z-VAD-fmk	100 µM	Caspasas	DMSO

**Tabla 3.** Listado de inhibidores, indicando la concentración final, vehículo y acción de inhibición, usados durante este trabajo.

## Silenciamiento génico, incorporación de plásmidos y ensayo luciferasa o de gen reportero.

### Silenciamiento génico

Las células tubulares se crecieron en un medio sin antibióticos hasta una confluencia de 40-60%. En ese momento transfectamos los siARNs específico y control durante toda la noche con *Lipofectamine RNAiMAX reagent*. Las condiciones de transfección fueron las descritas por el fabricante y el medio utilizado fue OPTI-MEM®I. Al día siguiente, retiramos el medio de

transfección para sustituirlo por medio fresco completo con suero. Incubamos las células durante uno o dos días para permitir el silenciamiento génico antes de agregar los estímulos.

Los silenciadores de GSK3 $\alpha$ , GSK3 $\beta$  (Santa Cruz) y VDR (Invitrogen) son comerciales y se utilizaron a una concentración de 20 nM. La secuencia del silenciador para Snail fue facilitada por la Dra. Ángela Nieto (Instituto de Neurociencias, Alicante), sintetizado por Invitrogen en calidad *Stealth* y utilizado a una concentración de 50 nM.

Secuencia sentido: 5'-AUCUCUUCACAUCCGAGUGGGUUUG-3'

Secuencia antisentido: 5'-CAAACCCACUCGGAUGUGAAAGAGAU-3'

### Incorporación de plásmidos

Células tubulares en 40-60% de confluencia se transfectaron con 0,8  $\mu$ g de ADN plasmídico usando *FuGENE 6* empleando las instrucciones facilitadas por el fabricante para ello. El medio de transfección, OPTI-MEM®I, se sustituyó por medio fresco completo una vez finalizado el proceso. Para una expresión óptima de la proteína de interés, las células se incubaron durante uno o dos días antes de agregar los estímulos.

El plásmido de expresión GFP-Snail fue cedido por la Dra. Ángela Nieto.

### Ensayo luciferasa

Las células tubulares fueron sembradas en una densidad de  $8 \times 10^4$  células/pocillo en placas de seis pocillos. 24 horas después se llevó a cabo la transfección con *FuGENE 6* de los vectores pNF- $\kappa$ B-Luc y pRLTK (que contiene el gen luciferasa-renilla) en una proporción 10:1 y de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Tras 4 horas, se reemplazó el medio por RPMI sin suero y se estimularon las células. La actividad luciferasa fue cuantificada con el *luciferase assay system* en un luminómetro y la actividad fue normalizada con la actividad de renilla para controlar distintas eficiencias de transfección.

## Análisis proteicos

### Extracción de proteínas

Después de los distintos tratamientos, las células se rasparon en 1ml de PBS a 4°C. Una vez recolectadas, se centrifugaron a 2500 rpm durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se añadió buffer de extracción de proteínas totales al pellet. Usamos el vortex para resuspender las células en el buffer de extracción e incubamos la mezcla 30 minutos a 4°C para permitir una lisis celular completa. Después centrifugamos la mezcla a 14000 rpm durante 15 minutos y a

4°C, trasladamos el sobrenadante resultante a otro tubo y descartamos el pellet. Guardamos el extracto de proteínas a -20°C.

Para conseguir una extracción de proteínas diferencial y separar las proteínas nucleares de las citoplasmáticas se utilizó el kit de extracción NE-PER (Thermo Scientific) siguiendo el protocolo del fabricante. Para cuantificar la concentración de los extractos se utilizó el método BCA.

### **ELISA**

Tras el crecimiento e incubación de las células con los distintos estímulos, se cuantificó la concentración de proteínas del sobrenadante con el Kit comercial ELISA (BD Pharmingen) específico para las proteínas de interés (MCP-1 y TGF- $\beta$ 1).

### **Western Blot**

Los extractos proteicos se calentaron en un termobloque a 95°C durante 5 minutos en condiciones reductoras con 2-mercaptoetanol al 5%. A continuación, se separaron las proteínas por tamaño con electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida. El porcentaje de acrilamida de los geles se escogió dependiendo del tamaño de las proteínas a estudiar. Luego de completada la electroforesis, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Para ello, se usó un sistema de transferencia semihúmedo con unas condiciones de 1mA/cm<sup>2</sup> durante 90 minutos. Para comprobar la eficacia de la transferencia se tiñeron las membranas con rojo Ponceau. Después, se lavaron y se bloquearon con TBS-Tween (TBS-T) + 5% de leche desnatada o albúmina bovina (BSA) en polvo a TA durante un tiempo mínimo de 60 minutos. A continuación, las membranas se incubaron toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario correspondiente (Tabla 4) y al día siguiente, tras tres lavados de 10 minutos con TBS-T, con el correspondiente anticuerpo secundario (Tabla 4) durante 60 minutos a TA. Tras tres nuevos lavados de 10 minutos con TBS-T, las proteínas se detectaron mediante quimioluminiscencia (ECL). Para normalizar la cantidad de proteína cargada en los geles utilizamos varios métodos. En el caso del estudio de proteínas fosforiladas, se analizaron las formas constitutivas tras la detección de las fosforiladas mientras que para la normalización del resto de proteínas empleamos la detección de Tubulina- $\alpha$  o Gapdh. La intensidad de las bandas se analizó mediante el programa informático Gel Doc<sup>TM</sup> EZ Imager.



Proteína diana	kDa	Condiciones de incubación del Ac 1°	Ac 2° anti	Condiciones de incubación del Ac 2°	Casa comercial del Ac 1°	Casa comercial del Ac 2°
<b>Apaf-1</b>	130	1/1000 en TBS-T + 5% leche	Ratón	1/5000 en TBS-T + 5% leche	Transduction Laboratories-BD	Amersham
<b>Cadherina-E</b>	120	1/500 en TBS-T + 5% leche	Ratón	1/5000 en TBS-T + 5% leche	Transduction Laboratories-BD	Amersham
<b>Cadherina-E</b>	120	1/500 en TBS-T + 5% leche	Conejo	1/5000 en TBS-T + 5% leche	Cell Signaling	Amersham
<b>Caspasa 3 procesada</b>	17	1/1000 en TBS-T + 5% leche	Conejo	1/5000 en TBS-T + 5% leche	Cell Signaling	Amersham
<b>Fosfo-GSK3<math>\alpha</math>&amp;<math>\beta</math></b>	46-51	1/1000 en TBS-T + 5% leche	Conejo	1/5000 en TBS-T + 5% leche	Cell Signaling	Amersham
<b>Fosfo-I<math>\kappa</math>B<math>\alpha</math></b>	40	1/1000 en TBS-T + 5% leche	Conejo	1/5000 en TBS-T + 5% leche	Cell Signaling	Amersham
<b>Fosfo-JAK2</b>	125	1/1000 en TBS-T + 5% leche	Conejo	1/5000 en TBS-T + 5% leche	Invitrogen	Amersham
<b>Fosfo-p65</b>	65	1/1000 en TBS-T + 5% leche	Conejo	1/5000 en TBS-T + 5% leche	Cell Signaling	Amersham
<b>Fosfo-STAT3</b>	79-86	1/1000 en TBS-T + 5% leche	Conejo	1/5000 en TBS-T + 5% leche	Cell Signaling	Amersham
<b>Gapdh</b>	38	1/5000 en TBS-T + 5% leche	Ratón	1/5000 en TBS-T + 5% leche	Millipore	Amersham
<b>GSK3<math>\alpha</math>&amp;<math>\beta</math> total</b>	46-51	1/1000 en TBS-T + 5% leche	Conejo	1/5000 en TBS-T + 5% leche	Cell Signaling	Amersham
<b>JAK2 total</b>	125	1/1000 en TBS-T + 5% leche	Conejo	1/5000 en TBS-T + 5% leche	Cell Signaling	Amersham
<b>Slug</b>	30	1/500 en TBS-T + 5% leche	Conejo	1/5000 en TBS-T + 5% leche	Cell Signaling	Amersham
<b>Snail</b>	29	1/500 en TBS-T + 5% leche	Ratón	1/5000 en TBS-T + 5% leche	Cell Signaling	Amersham
<b>STAT3 total</b>	79-86	1/1000 en TBS-T + 5% leche	Conejo	1/5000 en TBS-T + 5% leche	Cell Signaling	Amersham
<b>Twist</b>	28	1/500 en TBS-T + 5% leche	Conejo	1/5000 en TBS-T + 5% leche	Santa Cruz	Amersham
<b>VDR</b>	51	1/1000 en TBS-T + 5% leche	Conejo	1/5000 en TBS-T + 5% leche	Santa Cruz	Amersham
<b>Vimentina</b>	57	1/5000 en TBS-T + 5% leche	Ratón	1/5000 en TBS-T + 5% leche	Transduction Laboratories-BD	Amersham
<b>Tubulina-<math>\alpha</math></b>	50	1/5000 en TBS-T + 5% leche	Ratón	1/5000 en TBS-T + 5% leche	Sigma-Aldrich	Amersham
<b><math>\beta</math>-Catenina</b>	92	1/1000 en TBS-T + 5% leche	Conejo	1/5000 en TBS-T + 5% leche	Santa Cruz	Amersham

**Tabla 4.** Listado de anticuerpos empleados para Western blot. Se indica peso molecular de la proteína diana del anticuerpo primario, la casa comercial y las condiciones de incubación tanto para el anticuerpo primario como para el secundario.

## Inmunofluorescencia

Crecimos las células en placas de 24 pocillos con un cubreobjetos de cristal en cada uno de ellos. Una vez acabado el experimento retiramos el medio de crecimiento y lavamos las células pegadas al cubreobjetos con PBS. A continuación, fijamos las células con PBS + 4% de PFA durante 20 minutos y las permeabilizamos (en caso de que fuera necesario) con PBS + 0,2%

Triton X-100. Para el bloqueo usamos una mezcla de PBS + 4% BSA + 10% de suero del animal de donde se obtuvo el anticuerpo secundario a utilizar. Los anticuerpos primarios específicos (Tabla 5) se incubaron en PBS + 1% BSA + 4% de suero toda la noche a 4°C y los secundarios correspondientes en PBS + 1% BSA durante 1 hora a TA. Entre cada uno de los pasos descritos lavamos las células tres veces durante 5 minutos con PBS + 1% BSA. Para teñir los núcleos incubamos las células con una mezcla de ioduro de propidio (IP; 0,05 µg/ml) o DAPI diluido en PBS (a la que se añade ARNasa) durante 15 minutos. Por último, montamos los cubreobjetos sobre portaobjetos con Mowiol, que dejamos secar a TA y guardamos a 4°C en oscuridad. Para analizar proteínas fosforiladas usamos TBS en lugar de PBS y para el marcaje de actina F utilizamos Faloidina marcada con rodamina sin necesidad de usar un anticuerpo secundario. Las imágenes fueron obtenidas con un microscopio confocal Leica modelo TCS SP5.

Proteína diana	Suero para bloqueo de	Dilución del Ac 1°	Ac 2° anti	Fluorocromo del Ac 2°	Casa comercial del Ac 1°	Casa comercial del Ac 2°
<b>Faloidina (Actina F)</b>	Oveja	1/1000	—	—	Sigma-Aldrich	—
<b>Fosfo-p65</b>	Oveja	1/200	Conejo	Alexa 488	Cell Signaling	Invitrogen
<b>Fosfo-STAT3</b>	Oveja	1/200	Conejo	FITC	Cell Signaling	Sigma-Aldrich
<b>p65 total</b>	Oveja	1/100	Conejo	Alexa 488	Santa Cruz	Invitrogen
<b>Snail</b>	Oveja	1/200	Ratón	FITC	Abcam	Sigma-Aldrich
<b>Vimentina</b>	Oveja	1/200	Ratón	FITC	Transduction Laboratories-BD	Sigma-Aldrich
<b>ZO-1</b>	Oveja	1/200	Conejo	FITC	Zymed Invitrogen	Sigma-Aldrich
<b>β-Catenina</b>	Oveja	1/200	Conejo	FITC	Santa Cruz	Sigma-Aldrich

**Tabla 5.** Listado de anticuerpos primarios y sus anticuerpos secundarios correspondientes utilizados en inmunofluorescencia indicando la proteína a la que se unen, las condiciones de uso, el fluorocromo conjugado con el anticuerpo secundario y la casa comercial.

### Ensayo de retardo de la movilidad electroforética (EMSA)

Las células fueron resuspendidas y homogeneizadas en buffer A. Las fracciones nuclear y citoplasmática fueron separadas por centrifugación a 1000xg durante 10 minutos. La fracción nuclear (pellet) se lavó dos veces con buffer A y se resuspendió en buffer A con 0,39M de KCl. Se incubó la mezcla durante 60 minutos a 4°C para permitir la extracción. A continuación, se centrifugó a 100.000xg durante 30 minutos. Los sobrenadantes resultantes se dializaron contra buffer C, después se purificaron por centrifugación y se almacenaron a -80°C. La concentración de proteínas nucleares se cuantificó por el método BCA.

El ensayo de retardo de la movilidad electroforética o EMSA (*Electrophoretic mobility shift assay*) se desarrolló empleando 8 µg de las proteínas nucleares extraídas y un oligonucleótido consenso (ADN ds, 0,5 ng) para NF-κB marcado con [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] dATP en tampón de unión de EMSA 1x, al que se incluyó Poly (dl-dC) como ADN competitivo. Tras la incubación, las muestras se separaron mediante electroforesis en geles de acrilamida-bisacrilamida al 6% en TBE 0,25x. Los geles se secaron y se expusieron a películas X-Omat durante 24 horas a -80°C. Para verificar la banda de NF-κB, se realizaron ensayos de competición con anticuerpos para p50 y p65. El oligonucleótido consenso para NF-κB es de origen comercial (Promega) y su secuencia es:

5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3'  
3'-TCA ACT CCC CTG AAA GGG TCC G-5'

## Análisis génico

### Extracción de ARN

Una vez finalizado el experimento las células se lavaron con PBS estéril y se extrajo el ARN total con el kit comercial *Tripure Isolation Reagent* (Roche Diagnostics) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras obtenidas se almacenaron a -80°C.

### RT-PCR

De cada muestra de ARN total, retrotranscribimos 1µg a ADNc mediante el kit comercial *High Capacity cDNA Reverse Transcriptase* (Applied Biosystems) usando un termociclador convencional. A continuación, 1-3 µl de cada muestra de ADNc fueron amplificados mediante el kit comercial *FastStart Universal Probe Master* (Roche Diagnostics) por PCR cuantitativa en tiempo real (q-RT-PCR) usando un *ABI Prism Real-Time 7500 PCR System* (Life Technologies). Los datos obtenidos se analizaron usando el programa informático *7500 System SDS Software v1.2b1c3* (método DeltaDelta Ct) suministrado por el fabricante. Las muestras fueron analizadas por triplicado y el número de copias de cada gen se normalizó midiendo la expresión del gen para la Gapdh. Los cebadores empleados fueron comerciales (Applied Biosystems) (Tabla 6).

## Apoptosis y muerte celular

Al término del experimento se recoge el sobrenadante mientras que las células que continúan pegadas son despegadas de la placa usando tripsina. Se neutraliza la tripsina con DFBS y se recogen las células en el tubo que contiene el sobrenadante antes retirado. Las células se

centrifugan a 1000 rpm durante 5 minutos, se retira el sobrenadante y el pellet se resuspende e incuba durante al menos una hora en una solución de tinción (ver composición en la parte final de esta sección) que contiene yoduro de propidio (IP). Para medir el porcentaje de células en apoptosis (población hipodiploide) se utilizó un citómetro de flujo FACSCalibur.

Por otro lado se tiñeron con DAPI los núcleos de células fijadas con formalina para observar cambios en la morfología nuclear típica por microscopía de fluorescencia.

## Ensayo de cierre de herida

Las células HK2 se cultivaron en su medio de crecimiento hasta confluencia y en ese momento se les privó de DFBS durante 16-24 horas. La lámina celular fue discontinuada mediante una punta de pipeta, las células se lavaron con suero fisiológico y luego se repuso el medio sin suero. Tras esto, se añadieron los estímulos y se mantuvieron durante 72 horas. Se tomaron fotos a intervalos de 24 horas con un microscopio de contraste de fase.

ADNc gen diana	Especificidad	Referencia
<b>Apaf-1</b>	Ratón	Mm-01223702_m1
<b>Cadherina-16</b>	Ratón	Mm-00483196_m1
<b>Cadherina-E</b>	Ratón	Mm-00486918_m1
<b>Claudina-1</b>	Ratón	Mm-00516701_m1
<b>Gapdh</b>	Ratón	Mm-99999915_g1
<b>Gapdh</b>	Humano	Hs-99999905_m1
<b>HNF1<math>\beta</math></b>	Ratón	Mm-00447459_m1
<b>Kim-1</b>	Ratón	Mm-00506686_m1
<b>MCP-1</b>	Ratón	Mm-00441242_m1
<b>MMP-9</b>	Ratón	Mm00442991_m1
<b>Ncoa-1</b>	Ratón	Mm-00447958_m1
<b>Ngal</b>	Ratón	Mm-01324470_m1
<b>RANTES</b>	Ratón	Mm-01302428_m1
<b>Slug</b>	Ratón	Mm-00441531_m1
<b>Snail</b>	Ratón	Mm-00441533_g1
<b>Snail</b>	Humano	Hs-00195591_m1
<b>TGF-<math>\beta</math>1</b>	Ratón	Mm-001178819_m1
<b>VDR</b>	Ratón	Mm-00437297_m1
<b>ZO1</b>	Ratón	Mm-00493699_m1

**Tabla 6.** Cebadores empleados en q-RT-PCR, su especificidad y la referencia comercial en Applied Biosystems.

## Experimentación con animales

Los experimentos se llevaron a cabo siguiendo las indicaciones de la guía para el cuidado y uso de los animales de laboratorio (Publicación NIH, N° 83-25, revisión 1996) y con la aprobación del comité ético institucional.

### Modelo de fracaso renal agudo (inyección de ácido fólico)

Se emplearon ratones C57/BL6 de 12-14 semanas de vida que recibieron una única inyección intraperitoneal de 250 mg/Kg de ácido fólico en 0,3 M de bicarbonato sódico como vehículo. Una única dosis de QM56 (100 mg/Kg) fue administrada por vía intravenosa 6 horas antes que el ácido fólico. Los ratones fueron sacrificados 24 horas después de la inyección del ácido fólico. Se sacrificaron tres grupos de 8 ratones cada uno: a) Sanos control (vehículo del ácido fólico), b) Fracaso renal agudo (ácido fólico más vehículo de QM56) y c) Fracaso renal agudo más QM56. La sangre se empleó para la medición de urea y los riñones fueron perfundidos *in situ* con suero salino frío antes de ser extraídos. Un riñón fue congelado en nitrógeno líquido para análisis génicos o proteicos y otro embebido y fijado en parafina.

### Modelo murino de Obstrucción Ureteral Unilateral (UUO)

Ratones de 12-14 semanas, deficientes para TWEAK (TWEAK-KO) o *wild type* C57BL/6 (WT), provistos por Biogen Idec (Campbell S, 2006; Ucero AC, 2013) fueron anestesiados y el uréter izquierdo fue ligado (n=5-6 por grupo) mientras que otros sufrieron la misma manipulación pero no se les ligó ningún uréter (sham, n=4 por grupo). Se les administró un analgésico peri-operativo y los ratones fueron sacrificados 2 o 7 días después de la operación. La recolección de tejidos del ratón fue similar a la llevada a cabo en el modelo de inyección de ácido fólico.

### Estudios histológicos

Las inmunohistoquímicas o inmunofluorescencias de tejido fueron llevadas a cabo en secciones de tejido embebido en parafina de 5 µm de grosor. Las secciones fueron desparafinadas con xilol y concentraciones graduadas de etanol y entonces se rehidrataron. El método de recuperación del antígeno fue el tampón citrato.

Para inmunohistoquímica, la actividad peroxidasa endógena fue bloqueada incubando las muestras con 3% de peróxido de hidrógeno/Metanol (1:1) durante 30 minutos a 25°C. Después, las secciones se cubren con PBS que contiene un 6% de BSA y un 10% de suero de oveja o caballo (dependiendo del origen del anticuerpo secundario) durante una hora a 37°C para reducir la tinción del fondo inespecífico, y luego se incuban con los anticuerpos primarios

específicos (Tabla 7) en PBS con 1% BSA durante una noche a 4°C. Se lavan con PBS y se incuban con el anticuerpo secundario correspondiente marcado con biotina. Finalmente, el tejido se revela con un complejo Avidina-Biotina-Streptavidina (Complejo AB) y tras lavar se tiñe con DAB, se realiza una contratinción con hematoxilina de Carazzi o PAS, se deshidrata y se monta en medio DPX.

Para inmunofluorescencia, después de la recuperación del antígeno, el tejido fue bloqueado en PBS con 6% BSA y 10% suero de oveja. Tras el paso de bloqueo, las secciones fueron incubadas con el anticuerpo primario correspondiente (Tabla 7) y más tarde con un anticuerpo secundario conjugado con el fluorocromo Alexa 488. Ambas incubaciones fueron de una hora a TA. Tras lavar con PBS, los núcleos del tejido fueron teñidos con DAPI y la tinción no específica eliminada con PBS. Se utilizó Mowiol acuoso para montar las muestras. Las imágenes fueron obtenidas con un microscopio confocal Leica TCS-SP5.

Proteína diana	Dilución del Ac 1º	Ac 2º anti	Casa comercial del Ac 1º
Caspasa 3	1/200	Conejo	Promega
CD3	1/200	Conejo	Dako Diagnostics
CD68	1/200	Ratón	Dako Diagnostics
Fosfo-p65	1/200	Conejo	Cell Signaling
p65 total	1/200	Conejo	Santa Cruz
$\alpha$ -SMA	1/200	Conejo	Dako Diagnostics

**Tabla 7.** Lista de anticuerpos primarios utilizados en estudios histológicos especificando la proteína a la que se unen, su correspondiente anticuerpo secundario, las condiciones de incubación y la casa comercial.

### Ensayo TUNEL®

Para analizar la muerte celular por apoptosis en tejido renal de ratón se utilizó la técnica de transferencia de dUTPs marcados con digoxigenina que, a su vez, está unida a anticuerpos marcados con peroxidasa al 3'OH de las cadenas fragmentadas del ADN mediante la enzima desoxynucleotidil transferasa (TdT) (TUNEL®). El número total de núcleos positivos fue cuantificado en 20 campos elegidos al azar (aumento de 40x) por riñón usando el programa informático *Image Pro Plus Software* (Media cybernetics, Bethesda).

## Síntesis del QM56

La nanomedicina polimérica antiapoptótica QM56 es resultado de la conjugación del peptidoide-1 y PGA. La síntesis de este compuesto se llevó a cabo en los laboratorios de “Proteínas y Péptidos” y “Polímeros Terapéuticos” del Departamento de Química Medicinal del Centro de Investigación Príncipe Felipe de Valencia.

Para conjugarla, 0,35 g de PGA, con un peso molecular entre 17000 y 43000 Daltons, se transformaron a PGA en forma protónica. El pH de la solución acuosa de PGA se ajustó a 2,0 con HCl (0,2 M). El precipitado resultante se aisló, dializó contra agua y liofilizó para obtener 0,25 g. A continuación, a 75 mg de PGA en seco se añadió N,N-DMF (8 ml) – DIC (26 ml; 0,16 mmol) y tras 5 minutos HOBt sólido (20,4 mg; 0,16 mmol) y se dejó agitando 15 minutos. Entonces se incorporó NH<sub>2</sub>-Gly-Gly-Peptide-1 (44 mg; 0,052; ratio molar PGA-peptide = 8,5) previamente sintetizado por síntesis en fase sólida basada en Fmoc y se ajustó el pH hasta 8,0 con DIEA. Para permitir la reacción se incubó esta mezcla durante 36 horas a TA. Cromatografía en capa fina mostró la completa conversión desde NH<sub>2</sub>-Gly-Gly-Peptide-1 (R<sub>f</sub> = 0,4) al polímero conjugado (R<sub>f</sub> = 0; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH= 90:10). Para parar la reacción, la mezcla fue vertida en CHCl<sub>3</sub>. El precipitado resultante fue recuperado y secado con vacío para conseguir el conjugado polimérico deseado. La solución de conjugado PGA-peptide fue conseguida disolviendo el producto anterior en NaHCO<sub>3</sub> (1,0 M). Esta solución acuosa se dializó contra agua destilada (MWCO 6,000 Da) para eliminar contaminantes de pequeño peso molecular y el exceso de sales. La liofilización del producto de la anterior diálisis nos dio como resultado un polvo blanco (92% de rendimiento). El contenido total de peptide de este conjugado polimérico, determinado por UV ( $\lambda$ = 282 nm), se encontraba en el rango de 25-30% (p/p).

## Análisis estadísticos

Los datos se expresaron como media  $\pm$  desviación estándar de la media (Media  $\pm$  SD). Excepto indicación específica, cada valor corresponde a un mínimo de 3 experimentos independientes. Para detectar diferencias entre dos grupos utilizamos el test no paramétrico de Mann-Whitney mientras que para comparaciones de tres o más grupos empleamos el test Krustall-Wallis. Consideramos una significación de  $p < 0,05$  como diferencia estadística entre los grupos comparados. Todos los cálculos se realizaron con el paquete estadístico SPSS 13.0 para Windows (SPSS Inc.).

## **Composición y uso de los medios de cultivo**

### **RPMI-1640**

**Composición:** De origen comercial, la composición completa del medio puede consultarse en la Web de Invitrogen (<http://www.invitrogen.com>) bajo la referencia: 31870-025.

**Uso:** Se empleó para el crecimiento de las células tubulares MCT y HK2.

### **DMEM**

**Composición:** De origen comercial, la composición completa del medio puede consultarse en la Web de Invitrogen (<http://www.invitrogen.com>) bajo la referencia: 12491-015.

**Uso:** Se empleó para el crecimiento de las células MEFs.

### **Opti-MEM®I**

**Composición:** de origen comercial, la composición completa del medio puede consultarse en la Web de Invitrogen (<http://www.invitrogen.com>) bajo la referencia 31985-047.

**Uso:** Este medio se utilizó para llevar a cabo los pasos necesarios del protocolo de transfección de material génico (tanto de vectores plasmídicos como de siARNs).

## **Composición y uso de soluciones tamponadas**

### **PBS**

**Composición:** 8 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,7 mM KCl y 0,14 mM NaCl pH 7,6.

**Uso:** en inmunofluorescencia para lavar las células y preparar las soluciones de bloqueo y de incubación de anticuerpos. Además, se usa para lavar las células antes de recogerlas y como medio que facilita el raspado de las células.

### **Tripsina-EDTA**

**Composición:** de origen comercial, la composición completa de esta solución puede consultarse en la Web de Lonza (<http://www.lonza.com/group/en.html>) bajo la referencia CC-5012.

**Uso:** se emplea para desprender las células adheridas en cultivo. La tripsina-EDTA elimina las uniones célula-célula y célula-matriz de modo que las células quedan suspendidas en el medio y pueden recogerse. La tripsina rompe las uniones de tipo peptídico entre los aminoácidos arginina y lisina. Por su parte, el EDTA secuestra los cationes Ca<sup>2+</sup> necesarios para algunas uniones celulares.



### TBS y TBS-T

**Composición:** 20 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl a pH 7,6. Para preparar el TBS-T se añade 0,05% de Tween 20 al TBS.

**Uso:** el TBS se usa en inmunofluorescencia para lavados, bloqueo e incubaciones de anticuerpos anti-proteínas fosforiladas y el TBS-T en Western Blot para lavados, solución de bloqueo e incubaciones de anticuerpos.

### Suero salino fisiológico

**Composición:** 0,9% ClNa de origen comercial (B.Braun).

**Uso:** se emplea para eliminar el suero bovino del medio antes de levantar las células con tripsina-EDTA o para cambiar el medio con DFBS por el medio sin DFBS.

### Tampón extracción proteínas totales

**Composición:** 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2mM EGTA , 0,2 % Triton X-100 y 0,3 % Igepal CA-630. Además se añade una píldora de inhibidores de fosforilasas (*PhosSTOP*) y una de inhibidores de proteasas (*Complete Mini EDTA-free*) por cada 10 ml de tampón.

**Uso:** este tampón se usa para lisar tanto la membrana citoplasmática como la nuclear de las células. Estas se resuspenden en este tampón usando el vortex, se permite la lisis durante 30 minutos, se centrifuga y se recoge el sobrenadante que contiene las proteínas celulares totales mientras que en el pellet quedan los restos de las membranas.

### Tampón A de EMSA

**Composición:** 10 mmol/L HEPES pH 7,8, 15 mmol/L KCl, 2 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L DTT y 1 mmol/L PMSF.

**Uso:** Se usa durante la extracción de las proteínas celulares para ensayos EMSA.

### Tampón C de EMSA

**Composición:** 20 mmol/L HEPES-NaOH pH 7,6, 20% Glicerol, 0,1 mmol/L NaCl, 5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mmol/L EDTA , 1 mmol/L DTT y 0,5 mmol/L PMSF.

**Uso:** Se usa durante la purificación de las proteínas celulares para ensayos EMSA.

### Tampón de unión de EMSA

**Composición:** 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 25 mM KCl, 1 mM EDTA, 4% glicerol, 0,25 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,125 mM ZnCl<sub>2</sub> y 5 mM DTT.

**Uso:** es el tampón donde se incuban los extractos nucleares junto con los oligonucleótidos de secuencia específica para factores de transcripción.

### Solución de tinción para citometría de flujo

**Composición:** PBS, Igepal CA-630 (0,5%), IP (25 µg/mL) y ARNsa (50 µg/mL).

**Uso:** las células recogidas se centrifugan y el pellet se resuspende en esta solución. Las células se incuban mínimo 60 minutos para que el IP pueda intercalarse en el ADN de las células en apoptosis. El Igepal CA-630 permite la entrada del IP a través de la membrana citoplasmática pero no por la membrana nuclear.

## Productos y casas comerciales

### Reactivos

[ $\gamma$ -32P]dATP	Amersham
2-mercaptoetanol	Sigma-Aldrich
2-propanol	Sigma-Aldrich
Ac bloqueante de TGF $\beta$ 1	R&D Systems
Ac.bloq de TGF $\beta$ 1	R&D Systems
Acrilamida/Bisacrilamida 29/1 (40%)	National Diagnostics
AG490	Calbiochem
Agua libre de ARNasas	Promega
APS	Merck
Bay 11-7082	Sigma-Aldrich
BCA	Thermo Scientific
BSA	Thermo Scientific
Cicloheximida	Sigma-Aldrich
Ciclosporina A	Calbiochem
Cloroformo	Merck
DAPI	Vector Laboratories
DMSO	Sigma-Aldrich
DTT	Biorad
EDTA	Serva
EGTA	Sigma-Aldrich
Estreptomicina	Lonza
Etanol	Merck
FBS	Lonza
Formaldehido	Merck
FuGENE 6	Promega
Glicerol	Carlo ERBA

Glicina	Sigma-Aldrich
H <sub>2</sub> NaPO <sub>4</sub>	Merck
HCl	Sigma-Aldrich
HEPES	Sigma-Aldrich
Igepal CA-630	Sigma-Aldrich
INF $\gamma$	Peprtech
Inh.II de JAK2	Calbiochem
Inhibidor de RNAsas	Promega
Ioduro de propidio	Sigma-Aldrich
ITEM-4	Biolegend
Jasplakinolide	Calbiochem
KCl	Sigma-Aldrich
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck
Lactacistina	Sigma-Aldrich
Leche desnatada en polvo	Nestle
LiCl	Sigma-Aldrich
Lipofectamina RNAimax	Invitrogen
LPS	Sigma-Aldrich
Membranas nitrocelulosa	Biorad
Metanol	Sigma-Aldrich
Mowiol	Polysciences Inc
NaCl	Sigma-Aldrich
NaOH	Merck
Oligonucleótido consenso de NF- $\kappa$ B	Promega
Opti-MEM	GIBCO
Paricalcitol	Abbot Laboratories
Partenolide	Sigma-Aldrich
PD98059	Sigma-Aldrich
Penicilina	Lonza
PMSF	Sigma-Aldrich
SB418256	Calbiochem
SB431542	Calbiochem
SDS	Sigma-Aldrich
Suero fisiológico	B.Braun
Tacrolimus	USBiological
TEMED	Sigma-Aldrich
TGF- $\beta$ 1	Peprtech
TNF $\alpha$	Peprtech
Tripsina-EDTA	Lonza
Tris	Sigma-Aldrich
Triton X-100	Sigma-Aldrich
TWEAK	Millipore
Tween 20	MP Biochemicals

z-DEVD-fmk

Calbiochem

z-VAD-fmk

Calbiochem

### Kits comerciales e instrumentación

BCA

Thermo Scientific

Citómetro de flujo FACSCalibur

Transduction Laboratories-BD

Complete Mini EDTA-free

Roche Diagnostics

Cubeta de electroforesis

Biorad

Dual Luciferase Reporter Assay System

Promega

ECL

Amersham

ELISA MCP-1 Kit

Transduction Laboratories-BD

ELISA TGF $\beta$ 1 Kit

Transduction Laboratories-BD

FastStart universal Probe Master

Roche Diagnostics

Fluorímetro

Tecan

Gel Doc TM EZ Imager

Biorad

High Capacity cDNA rev. Transcriptase

Applied Biosystem

Microscopio confocal TCS SP5

Leica

Nanodrop

Thermo Scientific

NE-PER kit

Thermo Scientific

PhosSTOP

Roche Diagnostics

Real-Time PCR System 7500

Applied Biosystem

Transferidor

Idea Scientific

Tripure isolation reagent

Roche Diagnostics



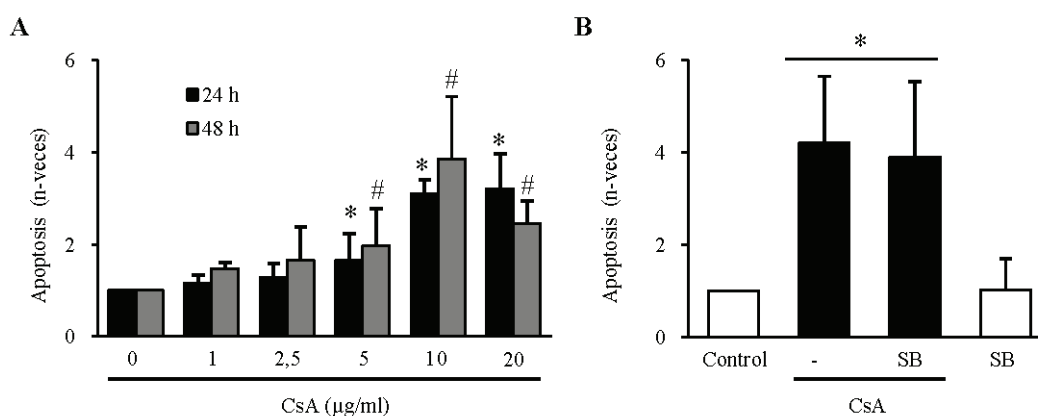
*Resultados*



## Parte I: Estudio de los mecanismos de la transición epitelio-mesénquima inducida por los inhibidores de calcineurina ciclosporina A y tacrolimus en el epitelio tubular renal

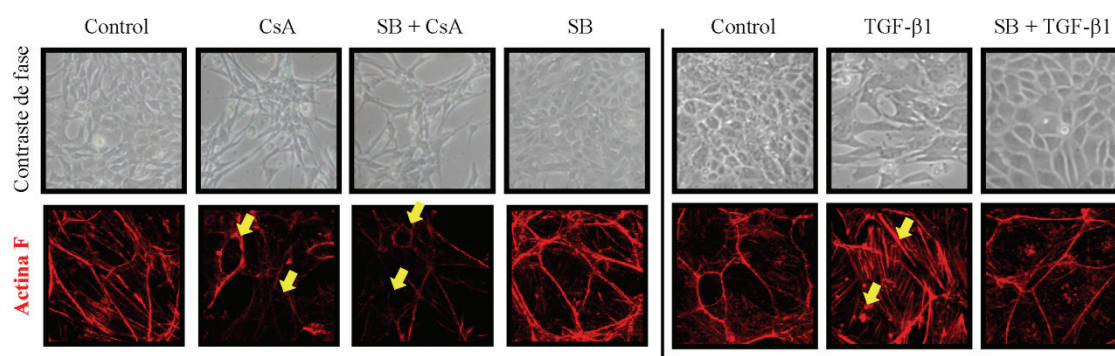
### 1.1. La ciclosporina A induce la reorganización del citoesqueleto de actina de forma independiente de la acción del TGF- $\beta$ 1 y de la producción de apoptosis

Mediante estudios iniciales llevados a cabo en células murinas epiteliales del túbulo proximal (MCT), confirmamos por citometría de flujo la acción apoptótica de la CsA utilizada a una concentración de 10  $\mu$ g/ml y durante un período de 24-48 horas (Figura 6.1.A). Concomitantemente al efecto apoptótico, las células experimentaron cambios morfológicos caracterizados por la pérdida de la estructura epitelial y de los contactos intercelulares, que fueron claramente detectados mediante microscopía de contraste de fase tras 24 horas de tratamiento (Figura 6.2). A nivel molecular, se evidenciaron cambios en el citoesqueleto de actina detectados mediante inmunofluorescencia (IF) con faloidina conjugada con rodamina. De este modo, las células tratadas con CsA durante 24 horas presentaron una pérdida de la actina cortical por despolimerización. En algunas células, este fenómeno se interpretó a partir de la redistribución de la actina en filamentos dispuestos en anillos contráctiles y otros radiales (Figura 6.2).



**Figura 6.1. La CsA induce apoptosis de manera tiempo y dosis dependiente sin intermediación del TGF- $\beta$ 1. A)** Cultivos de células tubulares MCT se trataron durante 24-48 horas con dosis crecientes de CsA (1-20  $\mu$ g/ml). La apoptosis se determinó por el contenido de ADN y posterior análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo. Los resultados se expresaron en relación al valor del control que permaneció sin tratar. Media  $\pm$  SD de 4 experimentos independientes. \* $p < 0,05$  y # $p < 0,02$  respecto al control. **B)** Cultivos de células MCT fueron tratados con CsA durante 48 horas en presencia o ausencia de SB431542 (SB) (inhibidor del receptor del TGF- $\beta$ 1 tipo 1), añadido al medio 60 minutos antes del tratamiento con el TGF- $\beta$ 1. La muerte celular por apoptosis se analizó como en A. Datos de 4 experimentos independientes. \* $p < 0,01$  respecto al Control.

Las modificaciones en los rasgos fenotípicos inducidas por la CsA caracterizan a la pérdida de uniones adherentes y estrechas que ocurre en el proceso de TEM y en patologías renales profibróticas (Matlin KC & Caplan MJ, 2000; Prozialeck WC & Edwards JR, 2007; Schneeberger EE & Lynch RD, 2004) (Figura 6.2). Numerosos estudios han demostrado que el TGF- $\beta$ 1 es un mediador de la apoptosis en el riñón y que está involucrado en los efectos nefrotóxicos de la CsA y en la promoción de cambios fenotípicos-característicos de la TEM (Feldman G, 2007; Slattery C, 2005). Sin embargo, la inhibición farmacológica de uno de los receptores del TGF- $\beta$ 1, denominado ALK5, con SB431542, no impidió el efecto apoptótico de CsA (Figura 6.1.B) ni tampoco influyó en los cambios morfológicos y en la distribución de la actina observados previamente (Figura 6.2). Para comprobar la eficacia y especificidad del inhibidor SB431542, las células tubulares se estimularon con TGF- $\beta$ 1. En esta condición experimental, las células experimentaron los mismos cambios morfológicos observados durante el tratamiento con CsA, que de acuerdo a lo esperado, fueron efectivamente inhibidos con SB431542 (Figura 6.2).



**Figura 6.2. La CsA induce cambios fenotípicos y reestructuraciones del citoesqueleto de actina de manera no dependiente de la actividad del TGF- $\beta$ 1.** Se utilizaron cultivos de células tubulares MCT tratados con 10  $\mu$ g/ml de CsA o 10 ng/ml de TGF- $\beta$ 1 durante 24 horas, ambos en presencia o ausencia de SB431542 (SB). En el panel superior se muestran imágenes obtenidas mediante microscopía de contraste de fase (aumento original 100x) donde se aprecia el cambio fenotípico de las células tratadas con CsA y con TGF- $\beta$ 1, respecto a controles no tratados. En el panel inferior se muestran imágenes de microscopía confocal de fluorescencia con faloidina marcada con rodamina para la detección de actina F. Las flechas indican células con menor contenido de actina cortical (tratamientos con CsA) o con condensación de la actina citoplasmática con formación de fibras de estrés (tratamientos con TGF- $\beta$ 1). Las células control o sólo tratadas con SB431542, muestran la típica red de actina situada en los bordes celulares o formando largas fibras de estrés citoplasmáticas. Las imágenes son representativas de 3 experimentos independientes.

Tomados en conjunto, estos resultados demostraron que las modificaciones estructurales en la distribución del citoesqueleto de actina y el consiguiente cambio morfológico producido por dosis apoptóticas de CsA eran compatibles con una inducción de TEM independiente de la actividad del TGF- $\beta$ 1. Como consecuencia, estudios específicos para dilucidar las bases moleculares de este fenómeno fueron llevados a cabo a continuación.

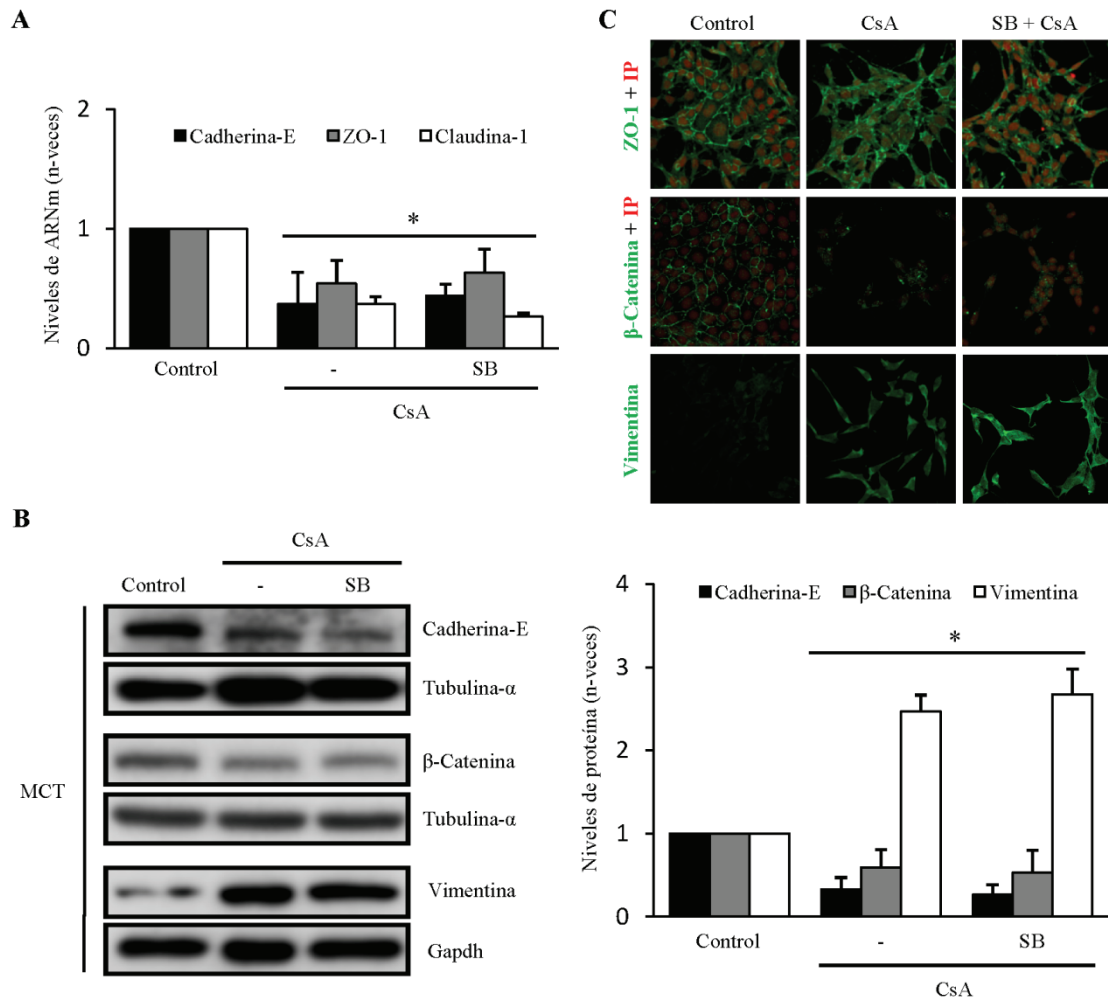


## **1.2. La ciclosporina A reduce la expresión de proteínas de las uniones adherentes y estrechas e induce la transición epitelio-mesénquima en células tubulares. Relación con la acción del TGF- $\beta$ 1 y con la reorganización del citoesqueleto de actina**

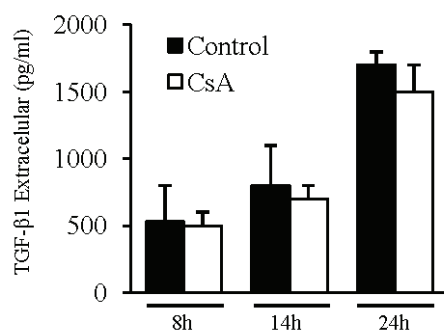
Primeramente se estudiaron los cambios en la expresión génica de proteínas prototípicas de las uniones adherentes, como la cadherina-E, y de dos proteínas representativas en la formación de las uniones estrechas como son ZO-1 y claudina-1 mediante q-RT-PCR. El tratamiento con CsA durante 24 horas provocó una disminución de la transcripción de las tres proteínas (Figura 7.1.A). Por otro lado, mediante Western Blot (WB) pudimos verificar que CsA produjo una disminución de la expresión de cadherina-E y de los niveles de la proteína clave para su anclaje al citoesqueleto, la  $\beta$ -catenina (Figura 7.1.B). Por IF y microscopía confocal se comprobó que las células sometidas a tratamiento con CsA, también acusaban la pérdida de ZO-1 y  $\beta$ -catenina de membrana (Figura 7.1.C). Además, las células estimuladas con CsA expresaron una proteína característica de las células mesenquimales como es la vimentina, comprobado tanto por WB como por IF (Figura 7.1. B y C). Todos estos cambios producidos por la CsA no se vieron afectados por el pretratamiento con SB431542 (Figura 7.1). Además, mediante un ELISA específico comprobamos que el tratamiento de las células tubulares con CsA no produjo la secreción de TGF- $\beta$ 1 (Figura 7.2).

La desestructuración de los filamentos de actina puede implicar un desmembramiento de las uniones adherentes y estrechas (Ivanov AI, 2008). De la misma manera, la pérdida de las estructuras de ensamblaje intercelular ha sido señalada como una de las causas de daño renal que puede ser mitigada con el uso de un potenciador natural de la estabilización y polimerización de actina como el Jasplakinolide (Bubb MR, 1994; Viñas JL, 2007). Para conocer si la despolimerización de actina que induce CsA influía en la pérdida de proteínas implicadas en adhesión, pretratamos las células tubulares con Jasplakinolide. Mediante IF y WB se comprobó que este tratamiento impidió la desorganización del citoesqueleto de actina inducido por la CsA (Figura 7.3.A), mientras que este inhibidor farmacológico no fue capaz de evitar la pérdida de cadherina-E y de ZO-1 (Figura 7.3.B).

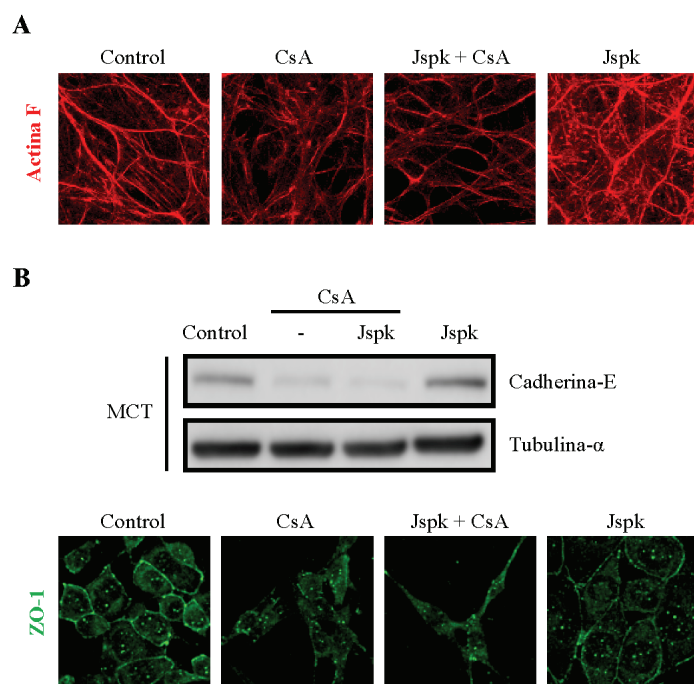
La conclusión de esta serie de experimentos es que la CsA modula la expresión de proteínas que conforman el entramado de interacciones de las uniones epiteliales y de marcadores mesenquimales que son característicos de la TEM, tanto en forma independiente a la acción de TGF- $\beta$ 1, como así también de la reorganización del citoesqueleto de actina.



**Figura 7.1. La CsA reduce la expresión de proteínas implicadas en adhesión celular y aumenta la expresión de proteínas mesenquimales en ausencia de actividad del TGF- $\beta$ 1.** Los experimentos se llevaron a cabo en células MCT tratadas con 10  $\mu$ g/ml de CsA y 1  $\mu$ M de SB431542 (SB). **A)** Niveles transcripcionales de cadherina-E, ZO-1 y claudina-1, analizados mediante q-RT-PCR, en células estimuladas con CsA durante 24 horas en presencia o ausencia de SB. Media  $\pm$  SD de 3 experimentos independientes. \* $p < 0,05$  respecto a control. **B)** Niveles de expresión de marcadores epiteliales y mesenquimales analizados por WB en células tratadas con CsA durante 48 horas con y sin pretratamiento con SB. La figura muestra experimentos representativos (panel izquierdo) y su correspondiente cuantificación mediante análisis densitométrico (panel derecho). Los resultados fueron normalizados en relación a la expresión de Gapdh o tubulina- $\alpha$  y expresados como aumentos respecto al control. \* $p < 0,02$  respecto al Control,  $n=4$ . **C)** Niveles de expresión y distribución de marcadores epiteliales y mesenquimales en células tratadas con CsA durante 48 horas en ausencia o en presencia de SB, analizados mediante microscopía confocal de fluorescencia. La marca verde indica la proteína específica y la marca roja los núcleos celulares teñidos con yoduro de propidio (IP). Imágenes representativas de 3 experimentos individuales. Aumento original 400x.



**Figura 7.2. El tratamiento de células tubulares con dosis apoptóticas de CsA no promueve la expresión de TGF- $\beta$ 1.** Evaluación de la concentración de TGF- $\beta$ 1 mediante ELISA en sobrenadantes de cultivos de células MCT tratadas con 10  $\mu$ g/ml de CsA durante 8, 14 y 24 horas. El gráfico de barras muestra la media  $\pm$  SD de 3 experimentos independientes, donde se observa que los niveles de TGF- $\beta$ 1 en las células tratadas con CsA son indistinguibles de las células no sometidas a tratamiento.



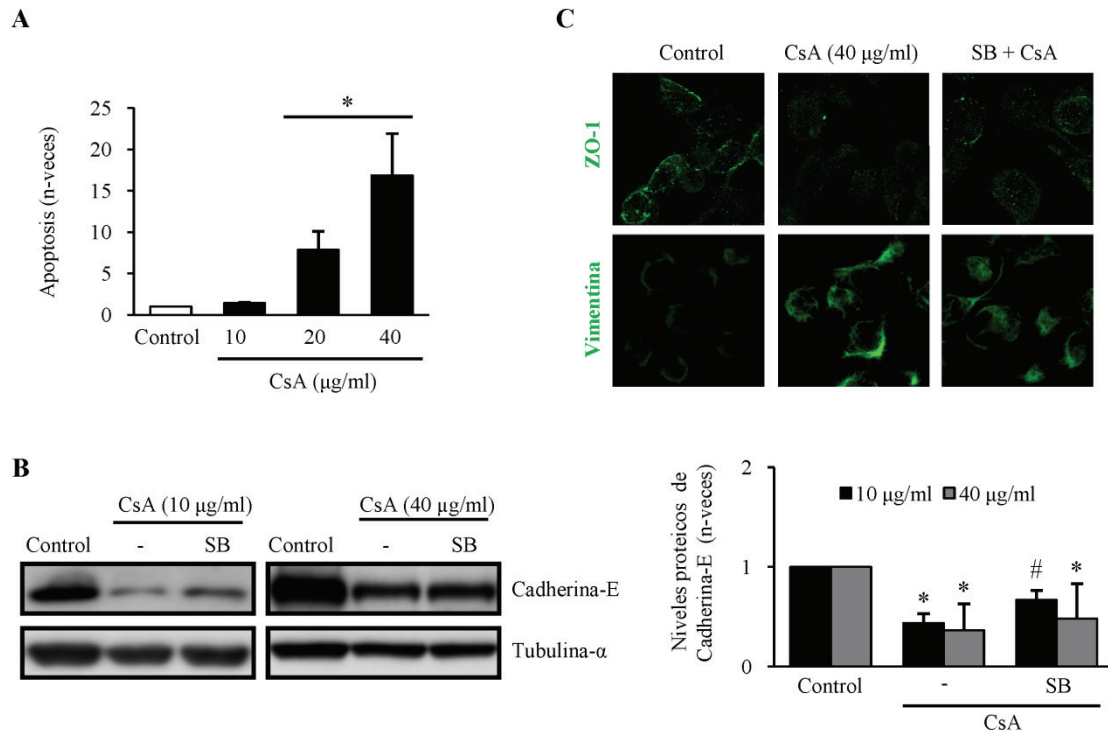
**Figura 7.3. La polimerización de actina no previene el descenso de los niveles de cadherina-E y ZO-1 inducidos por la CsA en células tubulares.** **A)** Imágenes de microscopía confocal de células tratadas con CsA durante 24 horas en presencia o ausencia del agente polimerizante de actina Jasplakinolide (Jspk, 50 nM). La marca roja corresponde a la actina F detectada mediante marcación fluorescente con faloidina conjugada con rodamina. **B)** WB (panel superior) de cadherina-E e imágenes de microscopía confocal para la detección de ZO-1 (verde, panel inferior) realizados en células MCT tratadas con 10  $\mu\text{g/ml}$  CsA y/o Jspk durante 48 horas.

### 1.3. Papel del TGF- $\beta$ 1 en la expresión de marcadores epiteliales o mesenquimales inducidos por ciclosporina A en células tubulares renales humanas

Para investigar si la inducción de TEM independiente de TGF- $\beta$ 1 en los tratamientos con CsA era relevante en células humanas, analizamos estas respuestas en células tubulares de este origen (HK2).

Previamente se describió que uno de los mediadores de la TEM observada en células HK2 expuestas a CsA era el TGF- $\beta$ 1 (McMorrow T, 2005). En nuestras condiciones de ensayo y en forma comparativa a las células MCT, las células HK2 necesitaron dosis mayores de CsA para inducir apoptosis (Figura 8.A). La estimulación con una concentración no letal de CsA (10  $\mu\text{g/ml}$ ) disminuyó la expresión de cadherina-E de una forma parcialmente dependiente de la actividad de TGF- $\beta$ 1 (Figura 8.B). Sin embargo, mediante WB e IF, comprobamos que una dosis letal o proapoptótica de CsA (40  $\mu\text{g/ml}$ ) disminuyó la expresión de cadherina-E y de ZO-1 y aumentó la expresión de vimentina, efectos no impedidos por el pretratamiento con SB431542 (Figura 8.C).

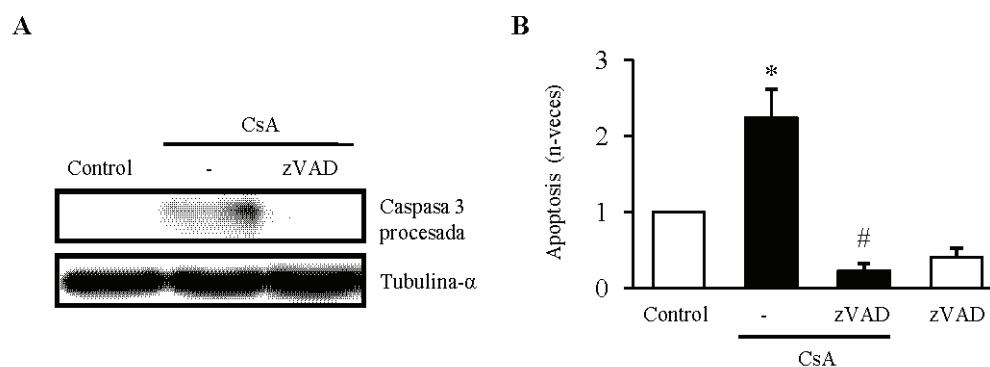
Así, podemos concluir que el papel de TGF- $\beta$ 1 en la inducción de la TEM por CNIs sería un fenómeno dependiente de la dosis del fármaco y ubicuo entre especies, y por lo tanto potencialmente relevante en la patología nefrotóxica humana debido a CNIs.



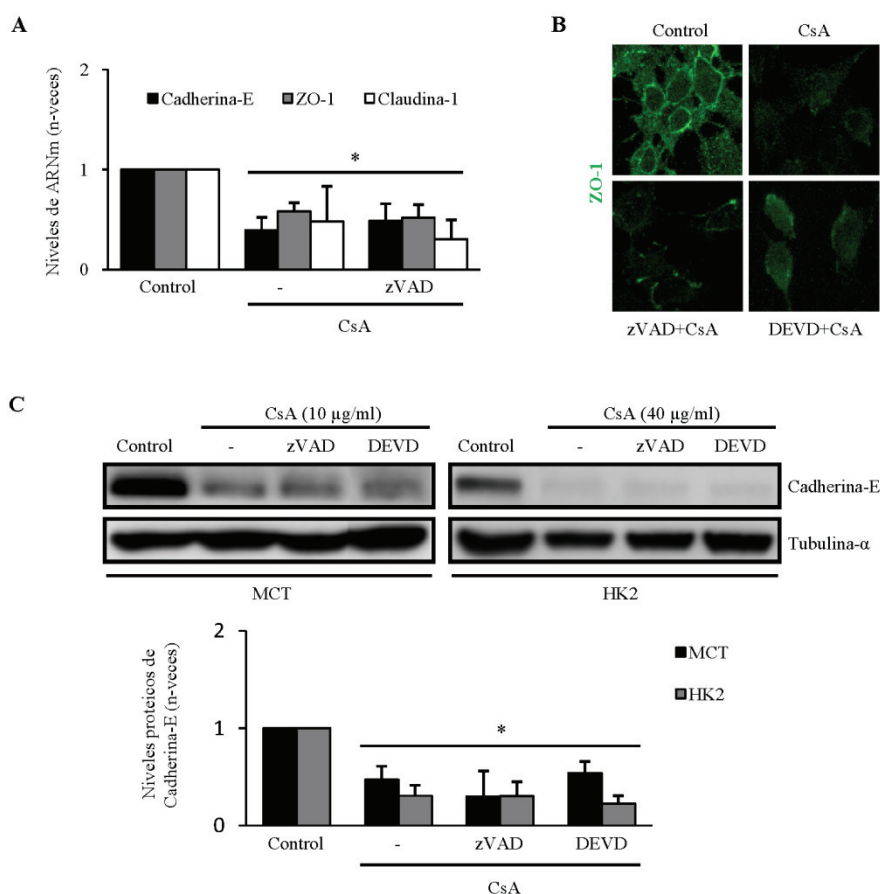
**Figura 8. En células tubulares humanas, la CsA induce la pérdida de cadherina-E y ZO-1 y la síntesis de vimentina sin participación del TGF-β1. A)** Tasa de apoptosis evaluada por citometría de flujo en células tubulares humanas HK2 estimuladas con distintas dosis de CsA durante 48 horas. La figura muestra los resultados de 3 experimentos independientes expresados como la media  $\pm$  SD. \* $p < 0,05$  contra valor Control. **B)** Análisis de los niveles de cadherina-E por WB de extractos de proteína de células HK2 estimuladas con dosis no apoptóticas (10  $\mu$ g/ml) y apoptóticas de CsA (40  $\mu$ g/ml), en presencia o ausencia de SB431542 (SB). En el panel de la izquierda se muestra una imagen representativa y en el panel de la derecha, el gráfico de barras resultante de la cuantificación de 3 experimentos independientes. \* $p < 0,05$  contra valor Control, # $p < 0,05$  respecto a CsA. **C)** Microscopía confocal de ZO-1 y vimentina en células HK2 incubadas con 40  $\mu$ g/ml de CsA en presencia o ausencia de SB431542 (SB). Aumento original 400x.

#### 1.4. La pérdida de proteínas de uniones adherentes y estrechas inducidas por la ciclosporina A es independiente de la apoptosis

La exposición de las células a agentes apoptóticos puede resultar en la inhibición de la síntesis de proteínas (Clemens MJ, 2000; Jeffrey IW, 2002). Además, se ha demostrado que las proteínas implicadas en adhesión, como las propias cadherina-E, ZO-1 y otras, pueden ser sustratos para caspasas activadas por nefrotóxicos (Keller SH & Nigam SK, 2003; Steinhilber U, 2001). Para conocer si la pérdida de expresión de las proteínas adhesivas por CsA se debía a interferencias del proceso de apoptosis, se investigó el papel de las caspasas activadas por CsA. Primero se confirmó por WB y citometría de flujo que el inhibidor general de caspasas, z-VAD-fmk, previno tanto la apoptosis como la activación de la caspasa 3 promovidas por el tratamiento con CsA (Figuras 9.1. A y B).



**Figura 9.1. La CsA produce apoptosis por una vía dependiente de caspasas. A)** WB representativo de la forma activa de la caspasa 3 en células MCT incubadas con CsA (10  $\mu$ g/ml) durante 24 horas en presencia o ausencia del inhibidor general de caspasas z-VAD-fmk (zVAD). **B)** Tasa de apoptosis evaluada por citometría de flujo en células MCT tratadas con 10  $\mu$ g/ml de CsA durante 48 horas en presencia o ausencia de zVAD. La representación gráfica muestra la media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes. \* $p < 0,05$  respecto al valor Control y # $p < 0,05$  contra valor de la CsA.



**Figura 9.2. La inhibición de caspasas no previene la disminución de la expresión de proteínas implicadas en adhesión inducida por CsA. A)** Análisis de los niveles de ARNm de cadherina-E, ZO-1 y claudina-1 mediante PCR cuantitativa en tiempo real en células MCT tratadas con CsA durante 24 horas en presencia o ausencia de zVAD. Los resultados mostrados en el gráfico pertenecen a 4 ensayos individuales. \* $p < 0,05$  contra Control. **B)** Imágenes de microscopía confocal que muestran la detección inmunofluorescente de ZO-1 en células MCT estimuladas con CsA durante 48 horas en presencia o ausencia de zVAD o del inhibidor de caspasa 3 z-DEVD-fmk (DEVD). **C)** La imagen muestra un WB representativo de cadherina-E en células MCT y HK2 estimuladas con CsA durante 48 horas en las dosis indicadas, en presencia o ausencia de los dos inhibidores de caspasas usados en B. En el panel inferior se representa la cuantificación por densitometría de 3 experimentos. \* $p < 0,05$  respecto al valor del Control sin tratamiento.

Sin embargo, el tratamiento con z-VAD-fmk no modificó los cambios de expresión de los ARN mensajeros de cadherina-E, ZO-1 y claudina-1 inducidos por CsA (Figura 9.2.A). De la misma manera, ni el z-VAD-fmk, ni la inhibición específica de la caspasa 3 con z-DEVD-fmk, modificaron los efectos de CsA sobre cadherina-E y ZO-1 en las células MCT y HK2 (Figuras 9.2. B y C).

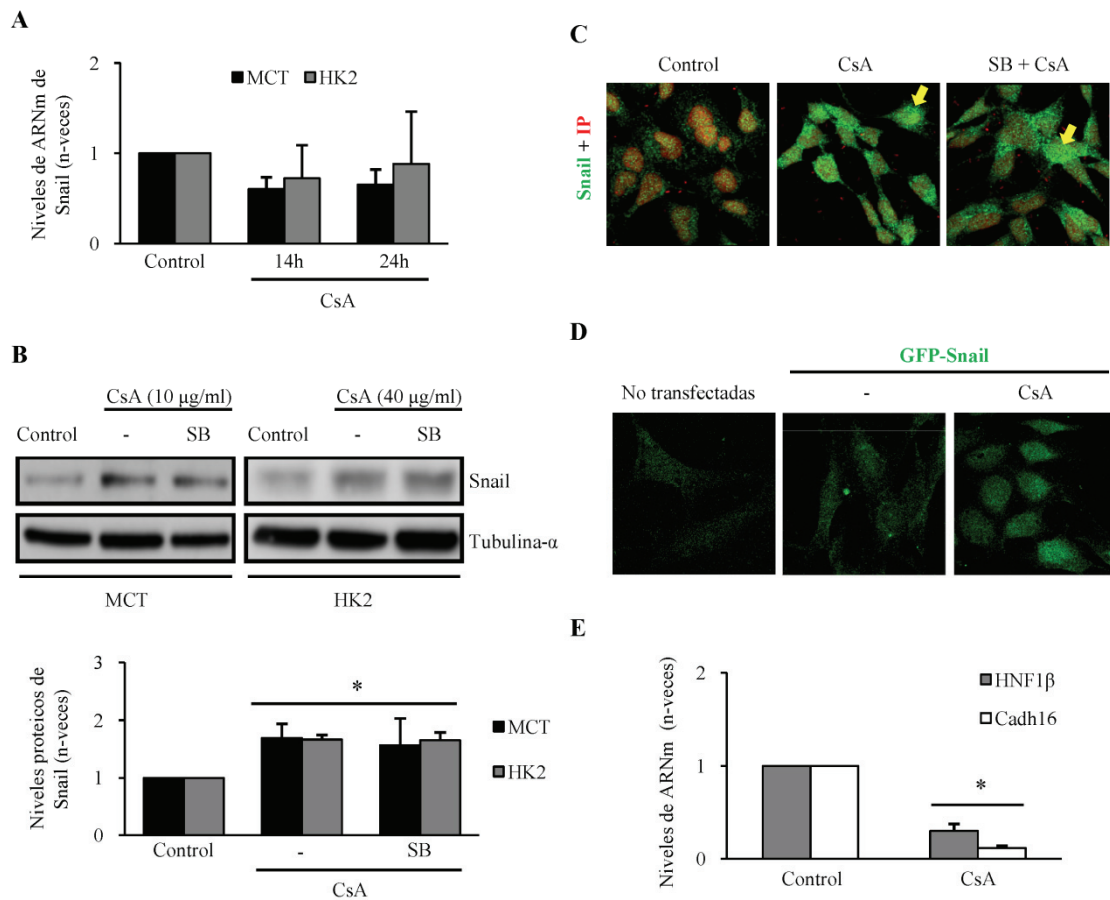
Estos resultados descartan una potencial degradación proteolítica de las proteínas de adhesión en las primeras 48 horas de tratamiento con CsA y sugieren que la pérdida de proteínas de adhesión inducida por CsA está enteramente regulada a nivel transcripcional.

### **1.5. La estabilización del factor de transcripción Snail es responsable de la modulación negativa de cadherina-E producida por ciclosporina A**

Estudios previos han mostrado que la sobreexpresión de Snail en células tubulares conduce a una pérdida de los niveles proteicos de cadherina-E (Moreno-Bueno G, 2006). Además, en un modelo murino de expresión condicional de Snail en riñón, la activación extemporánea del mismo reprime la expresión de cadherina-E y produce fibrosis (Boutet A, 2006). Nuestros experimentos demostraron que el tratamiento de células MCT y HK2 con CsA durante 14 horas no se tradujo en el aumento de los niveles de ARN mensajero de Snail medido por q-RT-PCR (Figura 10.1.A). Contrariamente, aumentos en los niveles proteicos y la translocación nuclear de Snail fueron detectados mediante WB (Figura 10.1.B) y microscopía confocal (Figura 10.1.C), respectivamente. Además, la sobreexpresión del plásmido GFP-Snail y posterior tratamiento de las células con CsA permitió corroborar tanto un aumento en la señal fluorescente como la acumulación en el núcleo del factor de transcripción (Figura 10.1.D).

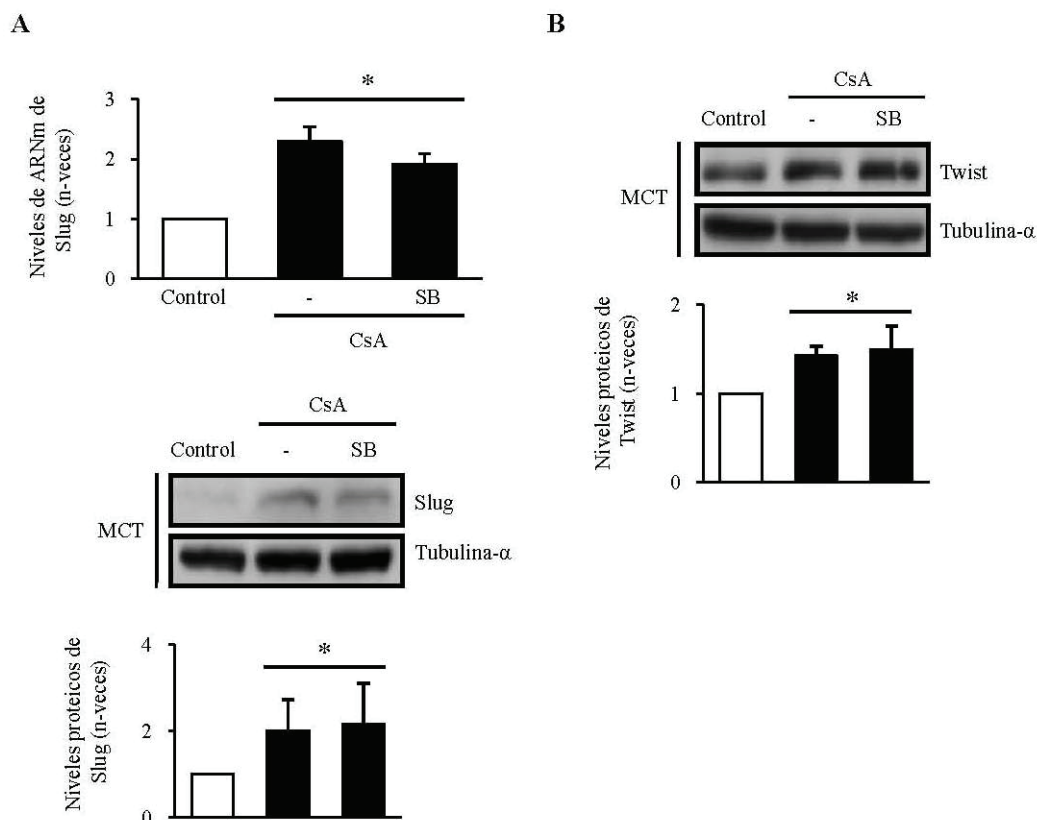
Snail es el único represor transcripcional conocido de la cadherina 16 específica de riñón y de su regulador transcripcional denominado *hepatocyte nuclear factor 1 homeobox B* (HNF1 $\beta$ ) (Boutet A, 2006). En relación, se comprobó que las células MCT tratadas con CsA también presentaron menores niveles de los mensajeros de ambos factores, HNF1 $\beta$  y cadherina-16, dando cuenta de la acción estimuladora de la CsA sobre Snail (Figura 10.1.E). De la misma manera, en células MCT tratadas con CsA, se comprobó un aumento de la expresión génica y/o proteica de otros factores de transcripción que intervienen en la regulación de proteínas de las uniones adhesivas y estrechas, como Slug y Twist (Figura 10.2. A y B). De modo significativo, la inhibición del TGF $\beta$ 1 con SB431542, no impidió ninguno de estos efectos, interpretándose de este modo que las respuestas observadas fueron independientes de TGF- $\beta$ 1.





**Figura 10.1. La expresión de Snail inducida por CsA no está regulada a nivel transcripcional.** **A)** La CsA no modifica la transcripción de Snail. La figura muestra los niveles transcripcionales de Snail cuantificados por PCR en células MCT o HK2 incubadas con CsA a las dosis indicadas en B según el tipo celular durante 14 y 24 horas. El gráfico representa la media  $\pm$  SD de 4 experimentos independientes. **B)** La CsA induce aumentos en la expresión de Snail de forma independiente del TGF- $\beta$ 1. En el panel superior se muestran los niveles de expresión de Snail analizados por WB en células MCT y HK2 estimuladas con CsA durante 14 horas, en presencia o ausencia de SB431542 (SB). En el panel inferior se muestra la representación gráfica de los valores obtenidos mediante densitometría de 3 ensayos independientes. \* $p < 0,05$  contra Control. **C)** Microscopía confocal de Snail en células MCT estimuladas como en B. La figura muestra imágenes representativas (aumento original 400x). Los niveles proteicos de Snail se incrementaron tanto en citoplasma como en núcleo (indicado por flechas amarillas). **D)** Microscopía confocal de Snail en células MCT transfectadas con un plásmido que expresa la proteína de fusión GFP-Snail y sometidas a tratamiento con 10  $\mu$ g/ml CsA durante 14 horas. **E)** Niveles de expresión génica de HNF1 $\beta$  y cadherina 16 (Cadh16) analizados por PCR cuantitativa en células MCT tratadas con 10  $\mu$ g/ml CsA durante 24 horas. Media  $\pm$  SD de 3 ensayos independientes. \* $p < 0,05$  respecto a valor Control.

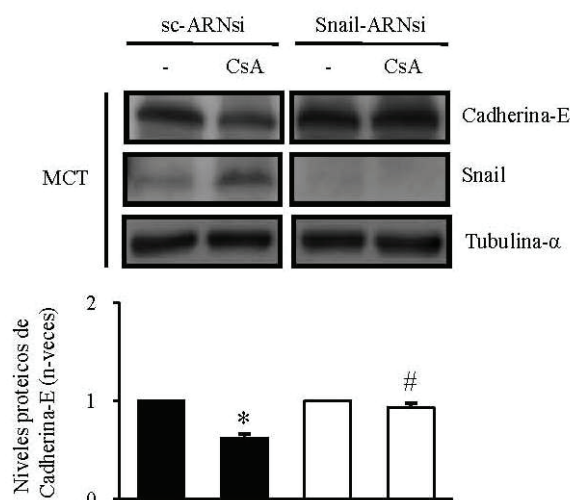
Para explorar mecanismos regulatorios de la cadherina-E, se suprimió la expresión de Snail en células MCT mediante silenciamiento génico. De este modo, comprobamos que la ausencia de Snail previno la caída de los niveles de cadherina-E evaluado por WB (Figura 10.3).



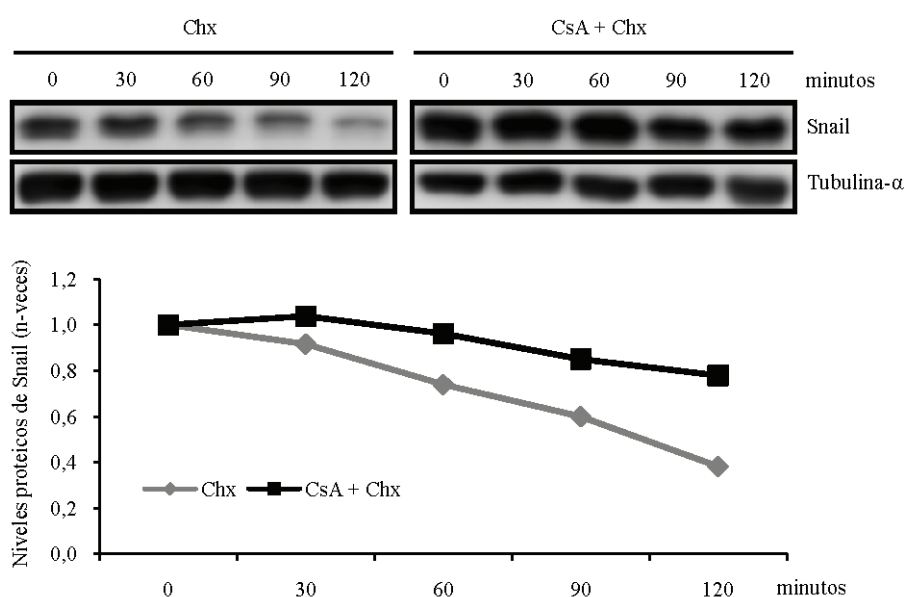
**Figura 10.2. La CsA induce la expresión de los represores transcripcionales de cadherina-E Slug y Twist. A)** En el panel superior se muestran los niveles de ARNm de Slug analizados por PCR cuantitativa en células MCT estimuladas con 10  $\mu$ g/ml CsA durante 14 horas con o sin SB431542 (SB). Los datos pertenecen a 3 experimentos independientes. \* $p < 0,05$  frente a valor Control. En panel inferior se muestra una imagen representativa del análisis mediante WB de los niveles de Slug. La gráfica muestra la cuantificación de 3 ensayos independientes y los resultados son expresados como la media  $\pm$  SD. \* $p < 0,05$  contra control. **B)** Análisis por WB de los niveles proteicos de Twist. Las células se trataron como en A. \* $p < 0,05$  frente a valor Control.

Debido a las diferencias observadas entre la regulación génica y proteica de Snail en los tratamientos con CsA, y con el objetivo de dilucidar el mecanismo de este efecto, se evaluó la estabilidad de Snail en experimentos con el inhibidor de la síntesis proteica cicloheximida. Para ello, las células HK2 se mantuvieron sin estimular o fueron preincubadas con CsA durante 14 horas, período tras el cual se añadió al medio la cicloheximida. Mediante WB, observamos que los niveles proteicos de Snail se mantenían comparativamente más expresados en las células tratadas con CsA que en las células control, sugiriendo un aumento en la vida media y mayor estabilidad de Snail debido a una menor degradación (Figura 10.4).





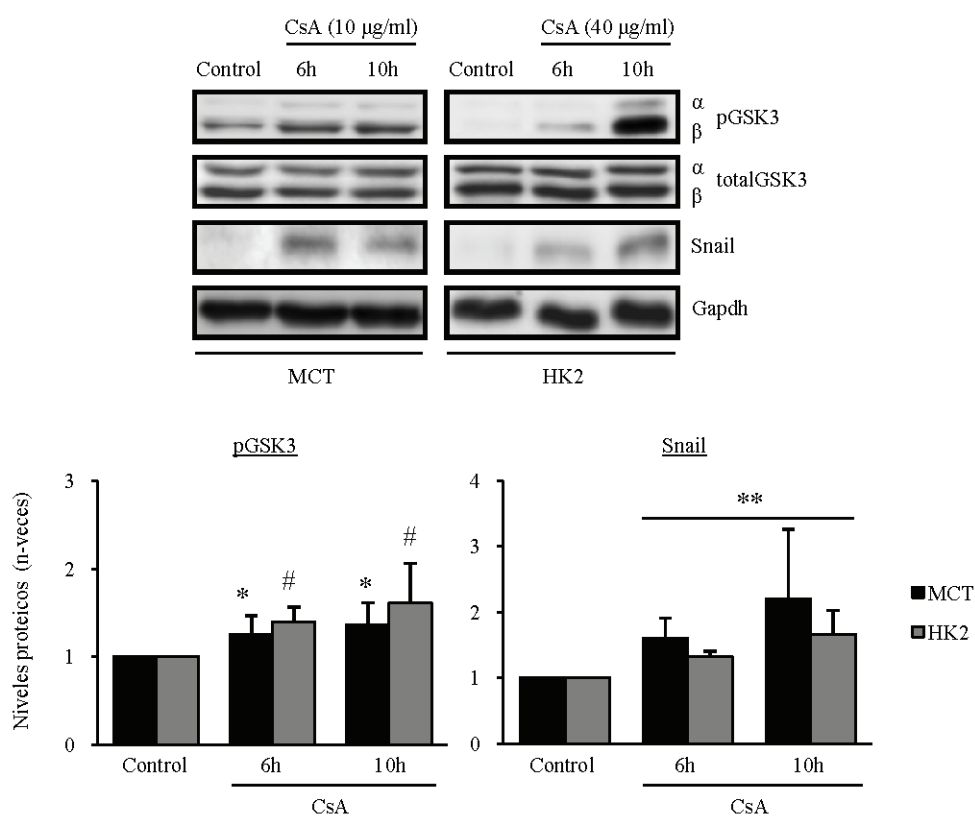
**Figura 10.3. El silenciamiento de Snail previene la pérdida de cadherina-E inducida por CsA.** La figura muestra los niveles de Snail evaluados mediante WB en células MCT transfectadas con un ARN de silenciamiento control (sc-ARNsi) o un ARN de silenciamiento específico para Snail (Snail-ARNsi). Posteriormente las células transfectadas fueron estimuladas con CsA (10  $\mu$ g/ml) durante 48 horas, analizándose seguidamente el contenido de cadherina-E y Snail mediante WB. El panel superior muestra una figura representativa mientras que el inferior muestra la cuantificación por densitometría de los niveles de la cadherina-E en 4 experimentos independientes. \* $p < 0,02$  frente a valor sc-ARNsi control y # $p < 0,02$  respecto a valor sc-ARNsi + CsA.



**Figura 10.4. La CsA promueve la estabilización de Snail en células tubulares.** Cultivos de células HK2 fueron mantenidos sin tratamiento o fueron tratados con CsA (40  $\mu$ g/ml) durante 14 horas. Seguidamente se añadió al medio cicloheximida (Chx, 10  $\mu$ M). Al término del tratamiento, las células se recolectaron a los tiempos indicados y la expresión de Snail se analizó mediante WB. La figura muestra un experimento representativo de un total de 3 (panel superior) y su correspondiente cuantificación densitométrica (panel inferior).

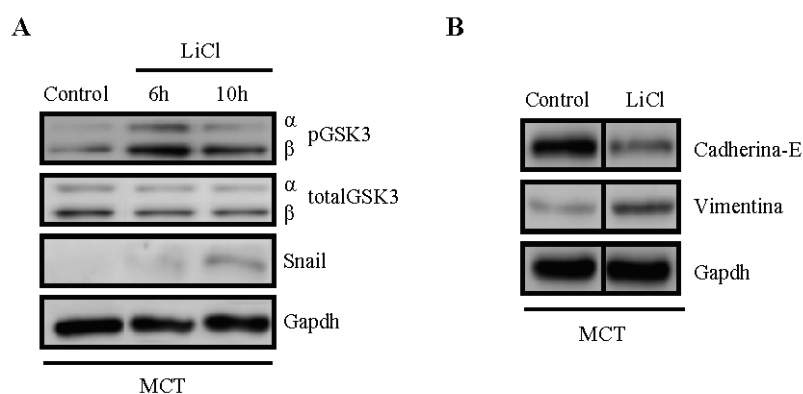
### 1.6. Papel de la enzima GSK3 en la regulación de las proteínas de adhesión por ciclosporina A

La fosforilación de la forma activa de Snail por la enzima glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3) permite la exportación nuclear y subsiguiente degradación de Snail fosforilado. La activación enzimática de GSK3 se inactiva por la fosforilación de las serinas 21/9 de las isoformas  $\alpha/\beta$  y esta inactivación de la actividad enzimática de GSK3 facilita la acumulación de Snail (Zhou BP, 2004). De acuerdo a estos antecedentes, decidimos investigar si modificaciones postraduccionales dependientes de fosforilación podían afectar la actividad de GSK3 en nuestro sistema y por lo tanto podrían estar potencialmente implicados en la acumulación de Snail en las células sometidas al tratamiento con CsA.



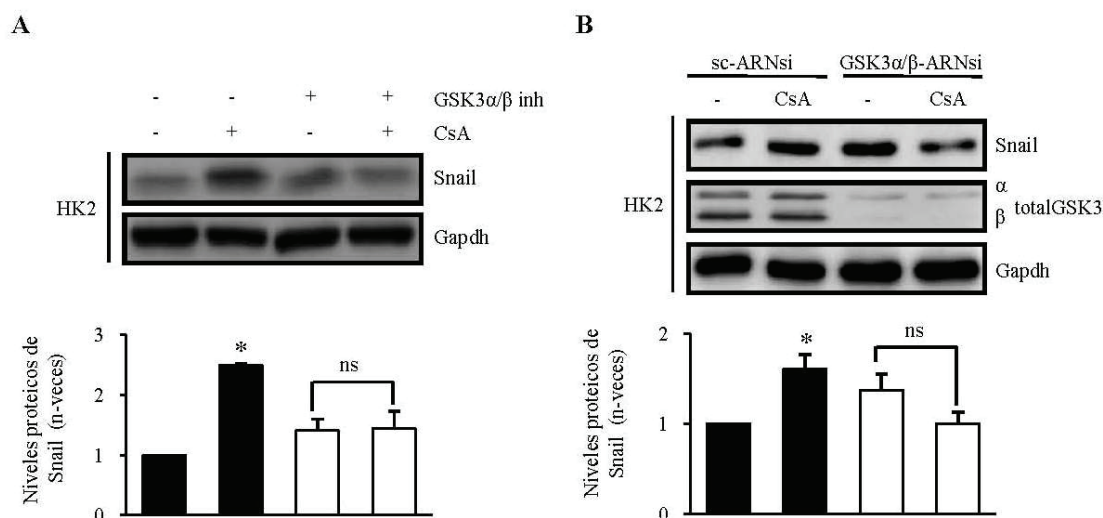
**Figura 11.1. La acumulación de Snail inducida por la CsA se correlaciona con la mayor fosforilación de la enzima GSK3.** Cultivos de células MCT y HK2 se trataron con 10 µg/ml y 40 µg/ml de CsA, respectivamente. La fosforilación de GSK3 y Snail se evaluó mediante WB (panel superior) y la correspondiente cuantificación de los niveles de ambas proteínas se muestra en el panel inferior. Como control de carga se usaron Gapdh y GSK3 $\alpha/\beta$  total. \*p < 0,01, #p < 0,05 y \*\*p < 0,05 respecto a valor Control. n=5.

Las células tubulares estimuladas con CsA durante 6 o 10 horas presentaron un mayor grado de fosforilación de las serinas 21/9 de GSK3 (evidencia de inactivación de GSK3) en comparación con las de células no estimuladas. Además, la fosforilación de GSK3 se asoció a una estabilización de Snail a los mismos tiempos (Figura 11.1). Este resultado es coherente con el mecanismo de acumulación de Snail mediante la inactivación de GSK3 debido a fosforilación selectiva en las serinas 21/9.



**Figura 11.2. La inhibición de la actividad de GSK3 con LiCl induce la estabilización de Snail.** **A)** Análisis mediante WB de los niveles de pGSK3 $\alpha/\beta$  y Snail en células MCT estimuladas con cloruro de litio (LiCl, 30 mM) durante los tiempos indicados. **B)** Ensayo similar al anterior pero estimulando las células durante 48 horas y posterior análisis de cadherina-E y vimentina. Se realizaron tres experimentos de los cuales se muestra una imagen representativa.

El cloruro de Litio (LiCl) y el inhibidor químico SB418256 son comúnmente empleados para inhibir la enzima GSK3 (Bachelder RE, 2005; Zhou BP, 2004). La incubación de las células tubulares con LiCl aumentó la fosforilación de GSK3 que se correlacionó con aumentos de expresión de Snail y de vimentina y con menores niveles de cadherina-E, efectos similares a los observados con CsA (Figura 11.2. A y B). La inhibición de la actividad de GSK3 por el pretratamiento con SB418256 o su silenciamiento mediante siARN en células HK2 produjeron un ligero aumento de los niveles basales de Snail. Sin embargo, ambos tratamientos impidieron una mayor acumulación de Snail en células incubadas con CsA (Figura 11.3. A y B). Estos resultados demuestran que la implicación de GSK3 es necesaria para la estabilización de Snail mediada por CsA.

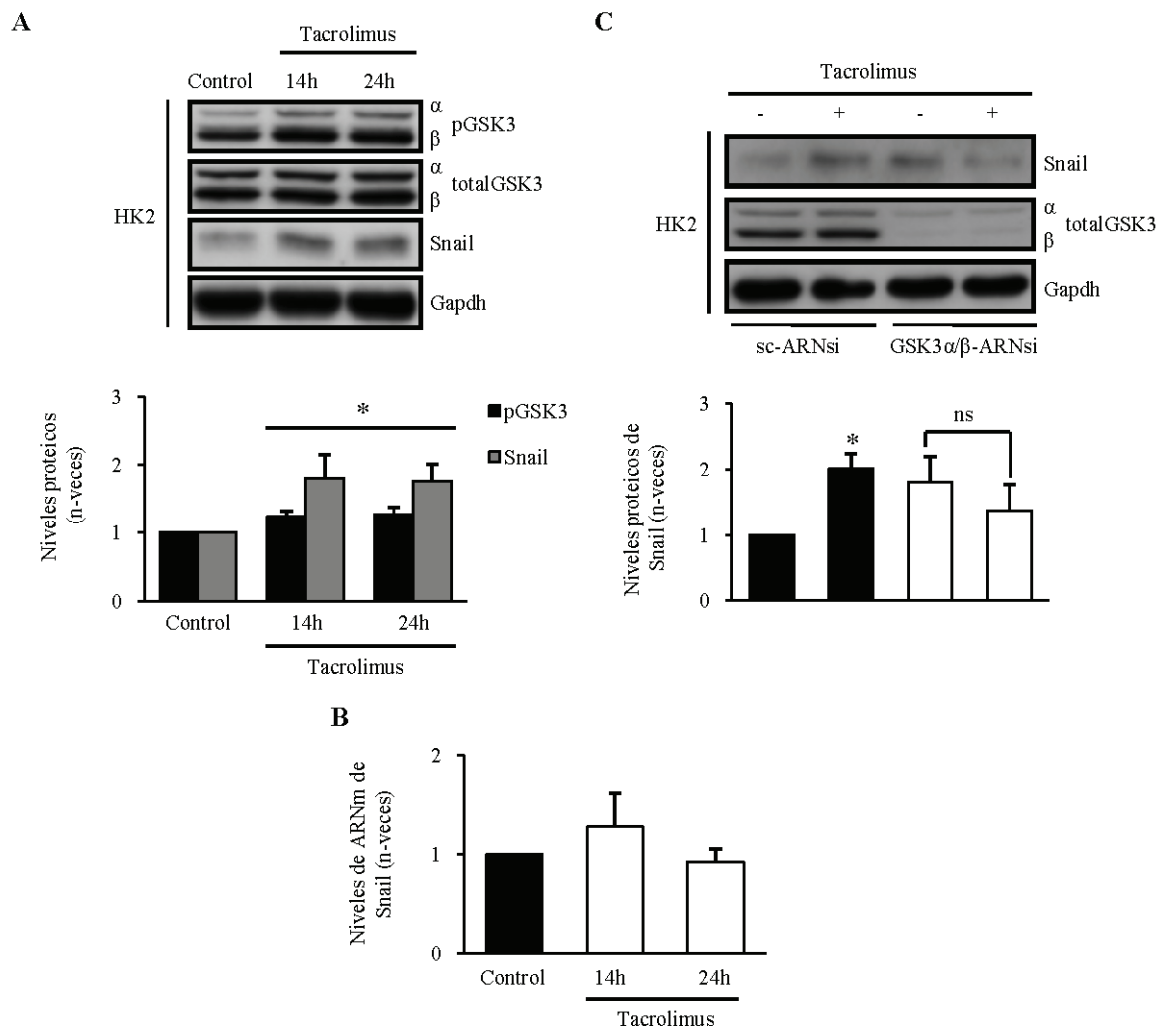


**Figura 11.3. El aumento de Snail inducido por la CsA es dependiente de la inactivación de GSK3. A)** Evaluación de los niveles proteicos de Snail en células HK2 tratadas con 40 µg/ml de CsA durante 10 horas, en presencia o ausencia del inhibidor químico de GSK3, SB418256 (GSK3α/β inh). **B)** Células HK2 se transfectaron con un ARN silenciador de GSK3 (GSK-3α/β-ARNsi) y luego se trataron y analizaron como en A. La Gapdh se usó como control de carga y la eficiencia de transfección y silenciamiento se evaluó mediante análisis de los niveles de GSK3α/β total. Se muestran los WB representativos de 3 ensayos independientes y su correspondiente cuantificación. \*p < 0,05 respecto a valor Control. ns= no significativo.

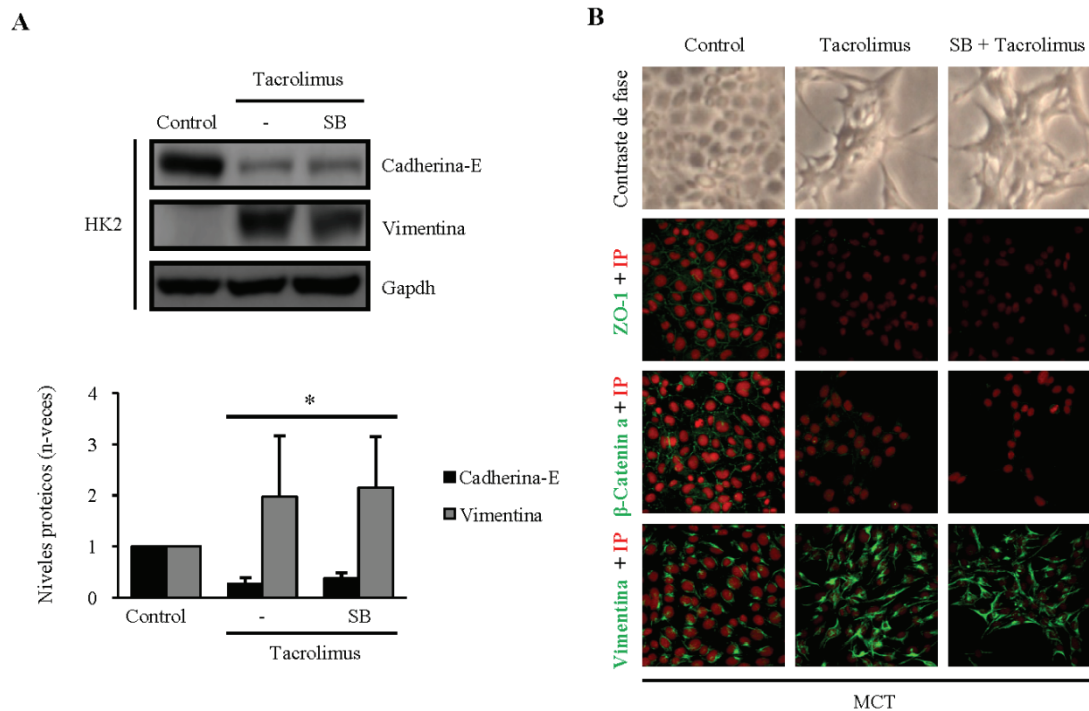
### 1.7. El tacrolimus mimetiza los efectos de ciclosporina A y regula la ruta GSK3/Snail/Cadherina-E en células tubulares renales

A pesar de sus diferencias estructurales y de interacción con moléculas receptoras citoplasmáticas de distinta naturaleza, el tacrolimus y la CsA comparten mecanismos comunes de inmunosupresión y de nefrotoxicidad (Naesens M, 2009). Sin embargo, las respuestas celulares al tratamiento con tacrolimus no han sido tan profundamente estudiadas y no hay información sobre los efectos de este inmunosupresor sobre proteínas de adhesión o sobre la TEM.

En células MCT o HK2, el tratamiento con tacrolimus produjo un aumento de la fosforilación de GSK3 y de la proteína Snail sin modificar sus niveles de ARN mensajero (Figura 12.1. A y B). El silenciamiento génico de GSK3 impidió, en células posteriormente tratadas con tacrolimus, el aumento de los niveles de Snail, sugiriendo mecanismos regulatorios postraduccionales de esta proteína similares a los observados para CsA (Figura 12.1.C). De la misma manera que CsA, tacrolimus también provocó cambios rápidos en la morfología de las células induciendo de igual modo la pérdida de proteínas epiteliales (cadherina-E, ZO-1 y β-catenina) y aumentos de expresión de vimentina (Figura 12.2. A y B). Todos los efectos observados por el tratamiento con tacrolimus, fueron también en este caso, independientes de la acción de TGF-β1, a juzgar por la ausencia de efecto del pretratamiento con SB431542.



**Figura 12.1. El tacrolimus inactiva GSK3 $\alpha$ / $\beta$  y aumenta los niveles proteicos de Snail.** Cultivos de células HK2 fueron estimulados con 20  $\mu$ g/ml de tacrolimus. **A)** Niveles de expresión de pGSK3 $\alpha$ / $\beta$  y Snail, evaluados mediante WB, en células tratadas con tacrolimus durante 14 o 24 horas. En el panel superior se muestra una figura representativa de 3 experimentos independientes, cuyos datos fueron cuantificados y expresados como la media  $\pm$  SD. \* $p < 0,05$  contra valor Control. **B)** Las células fueron tratadas como en A y el nivel de expresión génica de Snail se evaluó mediante PCR cuantitativa en tiempo real. **C)** WB representativo de Snail en células HK2 transfectadas con un sc-ARNsi o GSK3 $\alpha$ / $\beta$ -ARNsi previo a la estimulación con tacrolimus durante 14 horas. El gráfico de barras indica los resultados de 3 ensayos independientes. \* $p < 0,05$  respecto a sc-ARNsi.

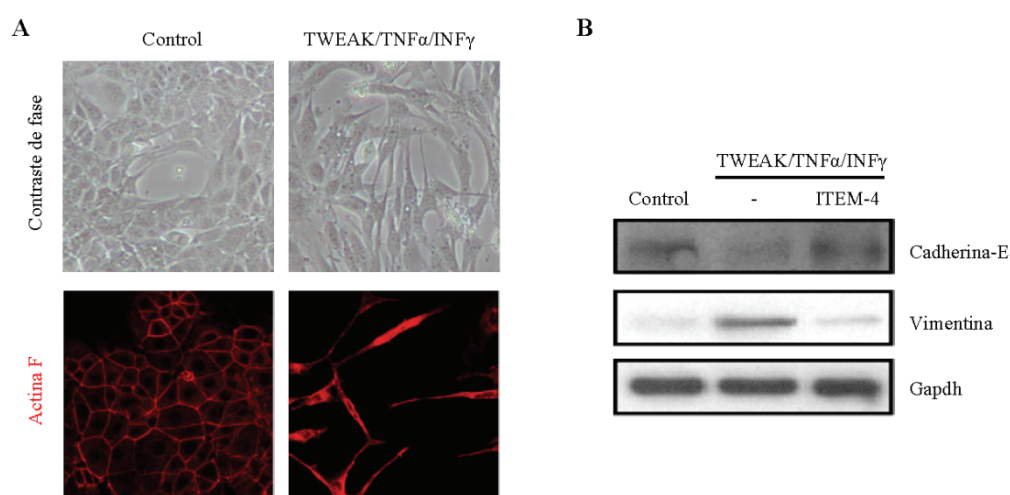


**Figura 12.2. El tacrolimus disminuye la expresión de proteínas implicadas en adhesión y eleva los niveles de vimentina. A)** Análisis mediante WB de los niveles de cadherina-E y vimentina en células HK2 tratadas con tacrolimus durante 48 horas, en presencia o ausencia del inhibidor del TGF- $\beta$ 1, SB431542 (SB). En la parte inferior de la figura se muestra la cuantificación de todos los experimentos llevados a cabo. \*p < 0,05 frente a valor Control, n=3. **B)** Evaluación de los cambios fenotípicos (analizados por microscopía de contraste de fase) y de los niveles proteicos y distribución subcelular de ZO-1,  $\beta$ -Catenina y vimentina (analizados por microscopía confocal) inducidos por el tratamiento de células MCT con tacrolimus. Las células fueron tratadas como en A.

## Parte II: Estudio de los mecanismos de la transición epitelio-mesénquima inducida por la citoquina TWEAK en el epitelio tubular renal

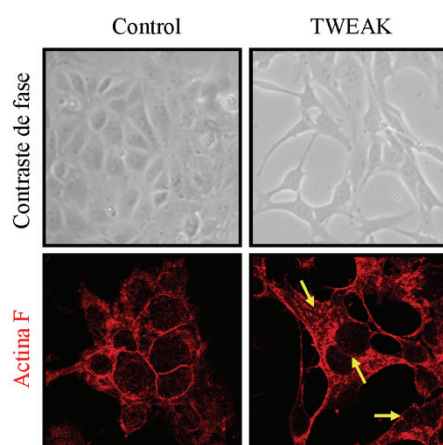
### 2.1. TWEAK induce la pérdida de proteínas de adhesión y la TEM de células tubulares renales

Trabajos previos demostraron que TWEAK induce la muerte apoptótica de células tubulares en presencia de las citoquinas inflamatorias TNF $\alpha$  e INF $\gamma$  (Justo P, 2006). De modo destacable, nuestros experimentos no solo confirmaron este comportamiento, sino también que esta combinación de citoquinas provocó una manifiesta transformación de morfología celular, que fue detectada mediante la simple observación con microscopía de contraste de fase (Figura 13.A). Además, TWEAK/TNF $\alpha$ /INF $\gamma$  estimuló la redistribución de los filamentos de actina F detectado por microscopía de fluorescencia (Figura 13.A). El pretratamiento de las células con anticuerpos bloqueantes del receptor de TWEAK, Fn14, impidió la pérdida de cadherina-E y la expresión de vimentina inducidos por el cóctel de citoquinas (Figura 13.B). La participación de Fn14 en la desestabilización de proteínas de uniones apicales epiteliales, sugirió que TWEAK podría también tener consecuencias sobre la diferenciación celular y producir una TEM de forma no dependiente de la acción concertada con otras citoquinas proinflamatorias.



**Figura 13. El TWEAK en asociación con las citoquinas proinflamatorias TNF $\alpha$  e INF $\gamma$  induce cambios en la morfología celular, en el citoesqueleto de actina y en la expresión de cadherina-E y vimentina. A)** Los cambios fenotípicos y en la expresión de la actina F en células MCT tratadas con TWEAK (100 ng/ml)/TNF $\alpha$  (30 ng/ml)/INF $\gamma$  (30 U/ml) durante 24 horas, se analizaron mediante microscopía de contraste de fases (aumento original 100x, panel superior) y microscopía confocal mediante marcación de la actina F con faloidina/rodamina (aumento original 400x, panel inferior), respectivamente. **B)** Análisis de los niveles de expresión de cadherina-E y vimentina mediante WB en extractos de células MCT tratadas con TWEAK/TNF $\alpha$ /INF $\gamma$  durante 48 horas, en presencia o en ausencia del anticuerpo neutralizante del receptor Fn14, ITEM-4 (2,5  $\mu$ g/ml). La figura muestra sendos WB representativos.

En efecto, el tratamiento de células MCT con TWEAK indujo en las primeras 24 horas el cambio de la forma cuboidal normal a un tipo celular con prolongaciones citoplasmáticas, pérdidas de contactos intercelulares y la disposición de las células en racimos. Esas alteraciones fenotípicas fueron acompañadas por modificaciones en el patrón de tinción de la actina F del citoesqueleto, la cual se dispuso en forma de fibras de estrés densamente empaquetadas (Figura 14). En conjunto, esos cambios moleculares y morfológicos inducidos por TWEAK sugirieron un desensamblaje y reensamblaje de las uniones celulares similar al experimentado por las células tubulares durante la TEM.

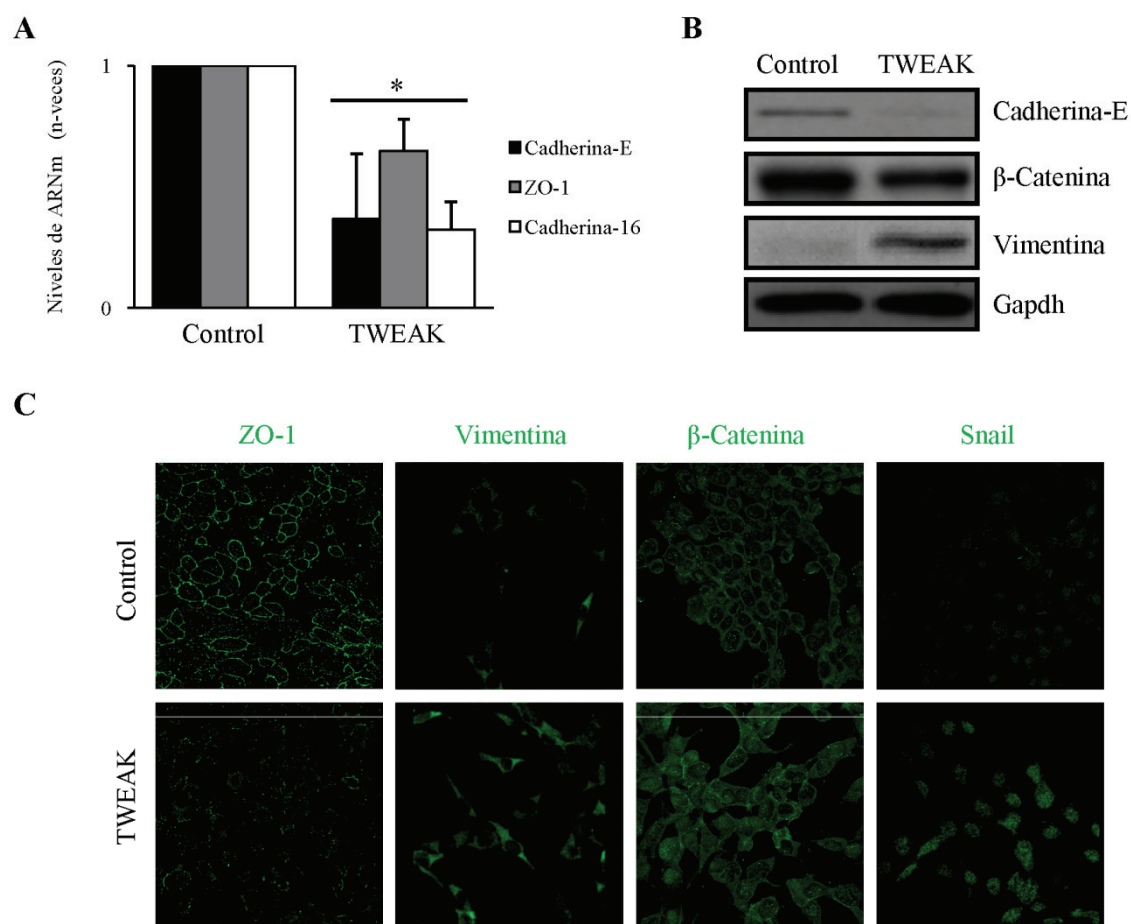


**Figura 14. TWEAK induce por sí mismo cambios en la conformación y la redistribución de la actina F en células tubulares renales.** Células tubulares murinas MCT se trataron con 100 ng/ml de TWEAK durante 48 horas y los cambios fenotípicos y los niveles y estados de polimerización de la actina F fueron evaluados mediante microscopía de contraste de fases y confocal en las mismas condiciones que las descritas en la figura precedente. En los controles, se puede observar que las células crecieron agrupadas en una monocapa. En contraposición, en presencia de TWEAK, la capa celular pierde su continuidad y las células adoptan formas fusiformes que se corresponden con un patrón de tipo fibroblastoide (panel superior). En el panel inferior, en células tratadas con TWEAK, las flechas indican áreas de tinción débil indicativas de la pérdida de actina F. La condensación citoplásmica de la marca fluorescente es característica de la formación de fibras de estrés.

Para una mayor exploración, se ensayó si TWEAK era capaz de regular la expresión de marcadores epiteliales y mesenquimales característicos de la TEM. En células MCT, TWEAK produjo un descenso en la transcripción de varios marcadores epiteliales, incluyendo cambios en cadherina-E, cadherina-16 y ZO-1 (Figura 15.1.A). Las modificaciones transcripcionales experimentadas por cadherina-E y ZO-1 fueron corroboradas a nivel proteico, junto con las modificaciones en la expresión de  $\beta$ -catenina, mediante ensayos de WB (Figura 15.1.B). Además, ensayos de microscopía confocal mostraron que la  $\beta$ -catenina, ubicada en la membrana citoplásmica en las células control, se reubicó en los compartimientos citoplásmico y nuclear (Figura 15.1.C). Además, TWEAK indujo una mayor expresión y translocación nuclear de Snail (Figura 15.1.C) y una mayor expresión génica de Slug (Figura 15.2). TWEAK reprimió también la transcripción del factor de diferenciación HNF-1 $\beta$ , el cual es una diana de Snail que



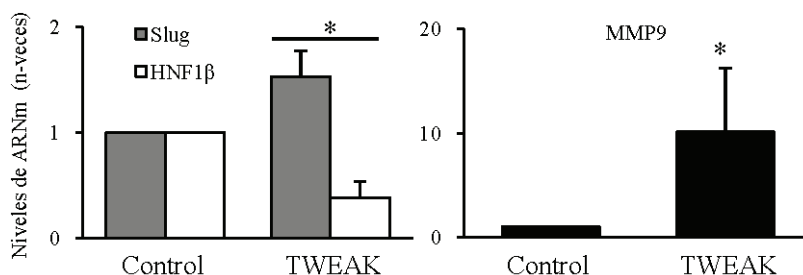
contribuye a la estabilización de los niveles basales de cadherina-16 (Peinado H, 2007) (Figura 15.2).



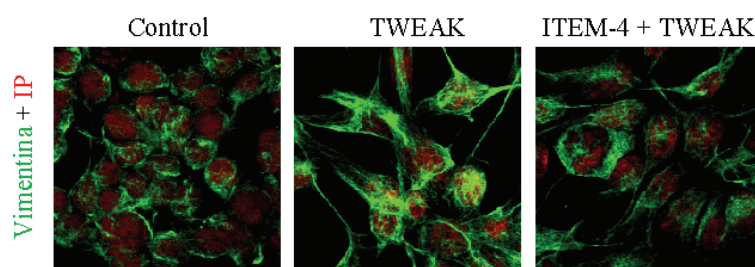
**Figura 15.1. TWEAK modifica la expresión de marcadores moleculares de TEM en células tubulares de ratón.** Las células MCT fueron tratadas con 100 ng/ml de TWEAK durante 24 horas (**A**) o 48 horas (**B** y **C**) para evaluar la expresión génica y proteica de marcadores y mediadores de la TEM. **A)** TWEAK reprime la expresión de los genes de cadherina-E, ZO-1 y cadherina-16. El gráfico de barras representa la media  $\pm$  SD de 3 experimentos independientes medidos por q-RT-PCR,  $*p \leq 0,05$  respecto a Control. **B)** TWEAK disminuye la expresión de cadherina-E y de β-Catenina mientras aumenta la de vimentina. WB representativos de un total de 3 experimentos independientes. **C)** Imágenes representativas obtenidas con microscopía confocal de células MCT estimuladas con TWEAK mostrando pérdida del ZO-1 de membrana, redistribución de la β-Catenina asociada a la membrana celular hacia el citoplasma, un aumento en los niveles de vimentina y la activación de Snail detectado por aumentos en la expresión tanto de la fracción citoplásmica como de la nuclear. Aumento original 200x.

Las metaloproteasas (MMPs) degradan las membranas basales y desorganizan las uniones intercelulares dependientes de cadherina-E y contribuyen de este modo a la TEM de las células epiteliales renales (Wang X, 2010; Zheng G, 2009). TWEAK incrementó de forma muy significativa la expresión del ARN mensajero de MMP9 tras 24 horas de tratamiento (Figura 15.2). Por otro lado, el tratamiento durante 48 horas con TWEAK produjo un incremento en la expresión del marcador mesenquimal vimentina evaluado por WB (Figura 15.1.B) o por inmunocitoquímica (Figura 15.1.C). Estos datos demostraron que TWEAK promueve la

adquisición de características fibroblásticas en células tubuloepiteliales murinas. A este respecto, la modulación de vimentina inducida por el tratamiento con TWEAK fue bloqueada por el pretratamiento de las células MCT con ITEM-4 (Figura 15.3), mostrando que los cambios globales asociados a la TEM inducidos por TWEAK fueron mediados por la unión de TWEAK a Fn14.



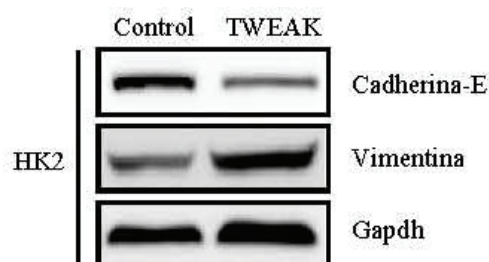
**Figura 15.2. TWEAK modifica la expresión de mediadores de la TEM en células tubulares de ratón. A)** TWEAK induce la expresión génica de Slug y disminuye la de HNF1β (panel de la izquierda) y también produce un aumento en la expresión de MMP9. Las células MCT fueron incubadas en presencia o ausencia de 100 ng/ml de TWEAK durante 24 horas y posteriormente se analizaron los niveles de ARNm de los genes de interés mediante q-RT-PCR. El gráfico mostrado está construido a partir de datos de 4 experimentos independientes, \*p < 0,01 frente a Control.



**Figura 15.3. TWEAK induce la TEM a través del receptor Fn14.** El bloqueo del receptor Fn14 con ITEM-4 (2,5 µg/ml) en los tratamientos con TWEAK (100 ng/ml) previno el aumento de los niveles de vimentina a las 48 horas. El ITEM-4 se añadió 60 minutos antes de agregar el estímulo. Las imágenes son representativas y se obtuvieron por microscopía confocal. Aumento original 200x.

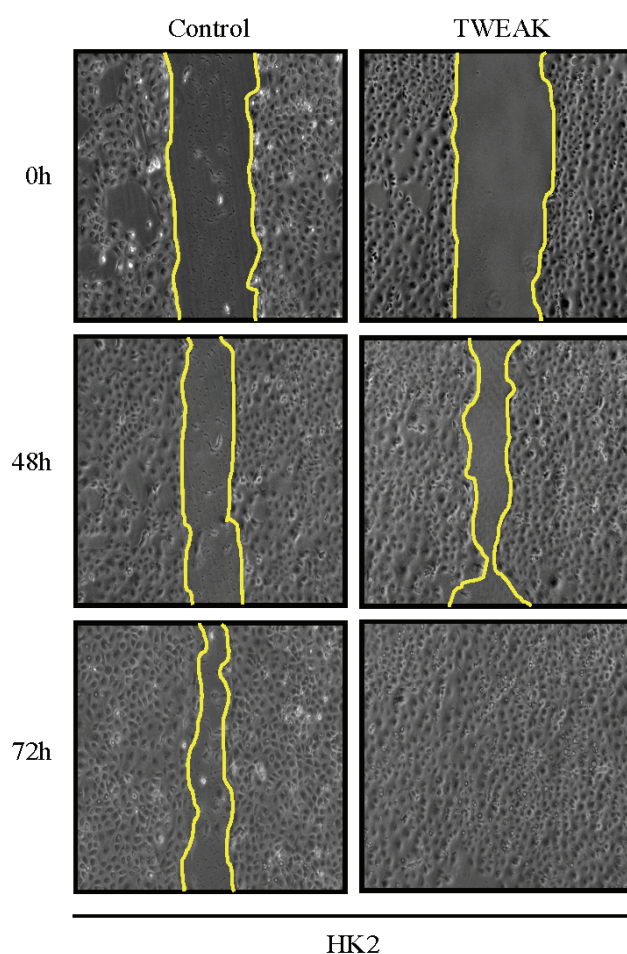
Para explorar si los resultados obtenidos en las células MCT eran extrapolables a células humanas, se realizaron experimentos confirmatorios en la línea HK2. En estas células, TWEAK también promovió la pérdida de expresión de cadherina-E y un incremento en los niveles de vimentina (Figura 16.1). Como las células HK2 son un modelo apropiado para evaluar la migración celular y el incremento de movilidad celular asociados a la TEM (Bozic M, 2011; Revenu C & Gilmour D, 2009), implementamos un ensayo de cierre de herida para evaluar la modulación de esta respuesta por TWEAK. Las células estimuladas con TWEAK cerraron la herida en tiempos comparativamente menores que aquellas no sujetas a estimulación con TWEAK, sugiriendo la pérdida de adhesión intercelular y TEM pueden ayudar a inducir un

fenotipo con mayor capacidad migratoria (Figura 16.2). Estos resultados confirmaron que la TEM inducida por TWEAK no es específica de células de ratón y puede suceder en sistemas celulares más próximos al tipo celular humano primario.



**Figura 16.1. TWEAK induce la TEM en células tubulares humanas HK2.** Cultivos de células HK2 fueron estimulados con 100 ng/ml de TWEAK durante 72 horas y los niveles de expresión de cadherina-E y vimentina se estudiaron mediante WB. La figura es representativa de 3 experimentos realizados de forma independiente.

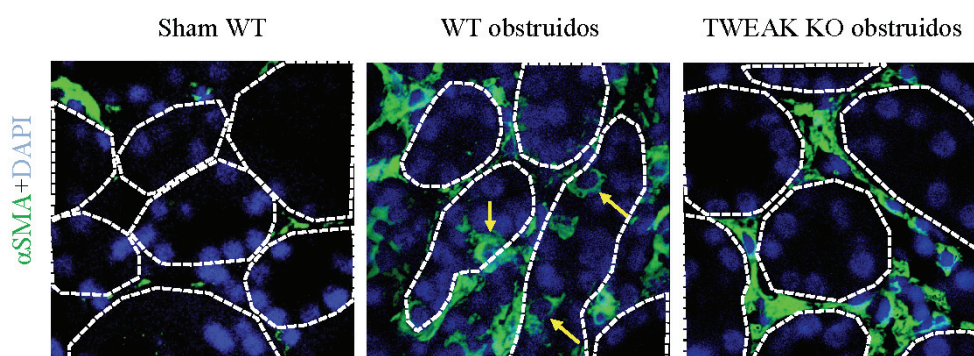
En conclusión, los cambios moleculares provocados por TWEAK en células tubulares podrían ser consistentes con un nuevo papel de esta citoquina como regulador de proteínas que participan en la adhesión celular y son partícipes de los cambios inducidos en el proceso de TEM.



**Figura 16.2. El tratamiento con TWEAK aumenta la migración en células HK2.** La migración de células HK2 incubadas durante 72 horas en presencia o ausencia de 100 ng/ml de TWEAK fue evaluada mediante un ensayo de cierre de herida. Las imágenes de la progresión del cierre de la herida fueron tomadas a los tiempos indicados usando un microscopio de contraste de fase (aumento original 200x). La figura muestra imágenes representativas.

### 2.2. La expresión incrementada de $\alpha$ SMA tubular durante la lesión renal obstructiva experimental esta disminuida en ratones deficientes para TWEAK

La  $\alpha$ SMA es un marcador prototípico de miofibroblastos que también es expresado en células epiteliales que han sufrido TEM (Meran S & Steadman R, 2011). Un modelo murino de fibrosis renal por ligadura del uréter (modelo experimental UUO) previamente desarrollado en el laboratorio, presentó un incremento masivo de  $\alpha$ SMA intersticial producto del incremento en el número de fibroblastos (Ucero AC, 2013). Utilizando este mismo modelo, evaluamos la expresión de  $\alpha$ SMA en células tubulares de riñones obstruidos provenientes de ratones WT y de ratones deficientes para TWEAK (Figura 17). Tras siete días de obstrucción, se observaron claramente algunas células tubuloepiteliales positivas para  $\alpha$ SMA en los riñones obstruidos de los ratones WT. Sin embargo, al igual que en los ratones WT del grupo Sham, las células con marcaje positivo para  $\alpha$ SMA no se encontraron en los ratones deficientes en TWEAK (TWEAK KO) sometidos al mismo procedimiento obstructivo (Figura 17). Este resultado sugirió que *in vivo*, TWEAK puede contribuir a la regulación de respuestas relacionadas con la TEM en modelos de daño renal obstructivo.

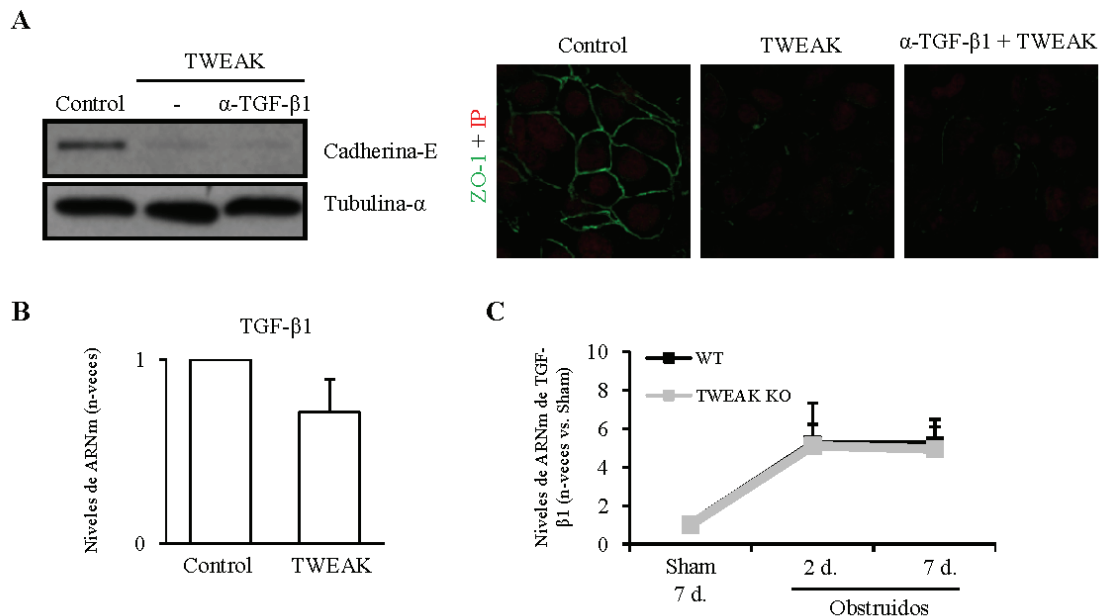


**Figura 17. Expresión tubular de  $\alpha$ SMA en el tejido renal de ratones en el modelo de daño renal por ligadura de uréteres UUO.** Expresión de  $\alpha$ SMA renal evaluada por inmunofluorescencia tras 7 días de obstrucción del uréter o intervención Sham. La  $\alpha$ SMA se encontró expresada en algunas células tubulares en los riñones de los ratones WT obstruidos, pero no en los túbulos de ratones operados Sham ni en los riñones obstruidos de los ratones deficientes en TWEAK (TWEAK KO), incluso en áreas específicamente seleccionadas por una mayor severidad de la lesión renal, como las mostradas en la figura. La línea discontinua delimita el área tubular. Las células tubuloepiteliales positivas para  $\alpha$ SMA (fluorescencia verde) son indicadas con flechas amarillas. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). Aumento original 160x.

### 2.3. La TEM inducida por TWEAK en células tubulares es independiente del TGF- $\beta$ 1

Evaluamos si el TGF- $\beta$ 1 endógeno podría estar involucrado en la TEM inducida por TWEAK. La preincubación de las células MCT con un anticuerpo neutralizante de TGF- $\beta$ 1, anteriormente

utilizado para bloquear la TEM y la producción de MEC inducida por Ang II a través de TGF- $\beta$ 1 (Carvajal G, 2008), no evitó la pérdida de cadherina-E y ZO-1 (Figura 18.A). Para investigar la relación entre TWEAK y TGF- $\beta$ 1 en el riñón, evaluamos si TWEAK regula la expresión del TGF- $\beta$ 1. El tratamiento de células MCT con TWEAK durante 24 horas no produjo un incremento de los niveles del ARN mensajero de TGF- $\beta$ 1 (Figura 18.B). Por otro lado, en animales del modelo de UUO, observamos que la expresión génica del TGF- $\beta$ 1 aumentó en los riñones de los ratones WT a los 2 o 7 días postobstrucción en comparación con la expresión observada en los ratones Sham control. Lo mismo sucedió en el grupo de ratones TWEAK KO, en los cuales el TGF- $\beta$ 1 renal también permaneció en niveles comparables a lo de los ratones WT obstruidos (Figura 18.C).



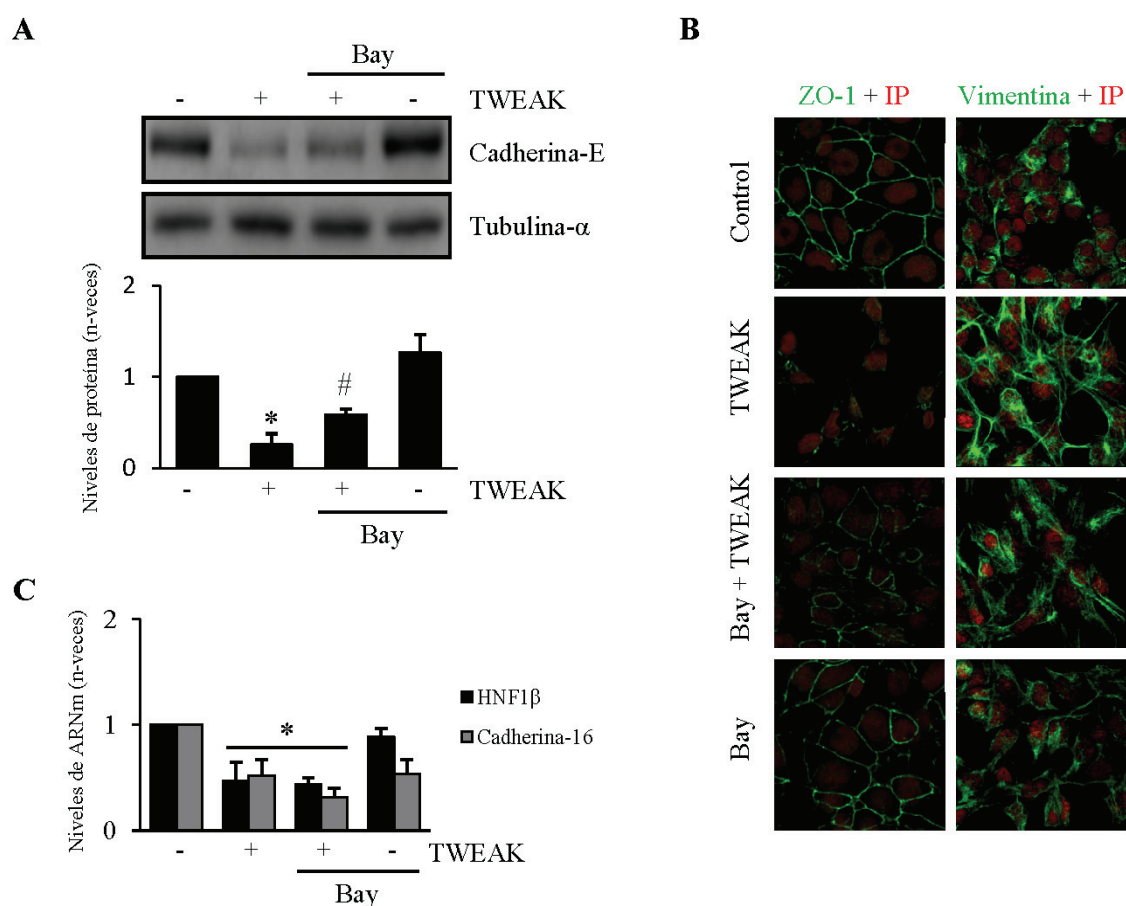
**Figura 18. La inducción de TEM por TWEAK es independiente de la acción de TGF- $\beta$ 1.** **A)** El bloqueo del TGF- $\beta$ 1 activo no previene la pérdida de cadherina-E (panel izquierdo) y de ZO-1 (panel derecho) inducido por TWEAK. Las células MCT fueron tratadas con 100 ng/ml de TWEAK durante 48 horas en presencia de un anticuerpo bloqueante de TGF- $\beta$ 1 ( $\alpha$ -TGF- $\beta$ 1, 10  $\mu$ g/ml) añadido al medio 60 minutos antes que el TWEAK. La figura muestra imágenes de WB o microscopía confocal representativas de 3 experimentos independientes. **B)** La transcripción de TGF- $\beta$ 1 en células MCT estimuladas con TWEAK durante 24 horas fue evaluada por q-RT-PCR. El gráfico representa la media  $\pm$  SD de 4 experimentos independientes. Los resultados obtenidos no demuestran diferencias significativas entre las células tratadas con TWEAK y los controles sin tratamiento. **C)** Transcripción de TGF- $\beta$ 1 en riñones de ratones WT y deficientes en TWEAK (TWEAK KO) en el modelo UUO evaluados por q-RT-PCR a 2 y 7 días tras la obstrucción del uréter. El gráfico representa la media  $\pm$  SD de la expresión del TGF- $\beta$ 1 de cada grupo experimental. No se encontraron diferencias significativas en la expresión del TGF- $\beta$ 1 entre ambos grupos.

Estos resultados sugirieron que TGF- $\beta$ 1 no está involucrado de forma directa en la TEM inducida por TWEAK.



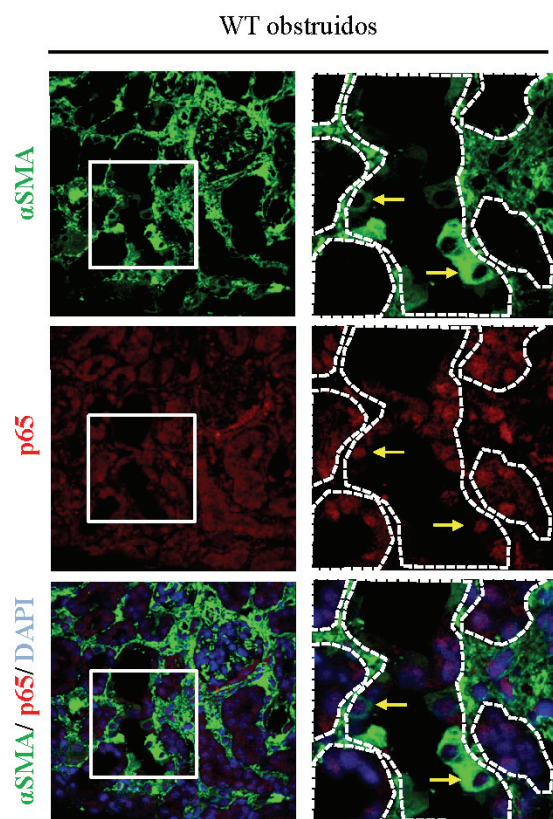
## 2.4. Papel de mediadores proinflamatorios en la TEM inducida por TWEAK en células tubulares: participación de NF-κB

Estudios previos de nuestro laboratorio han demostrado que TWEAK activa NF-κB en el riñón y en las células renales tubulares y podocitos, conduciendo a inflamación (Sánchez-Niño MD, 2013; Sanz AB, 2008; Sanz AB, 2010). Además, numerosos estudios en cáncer han demostrado que NF-κB regula el proceso de TEM (López Novoa JM & Nieto MA, 2009).



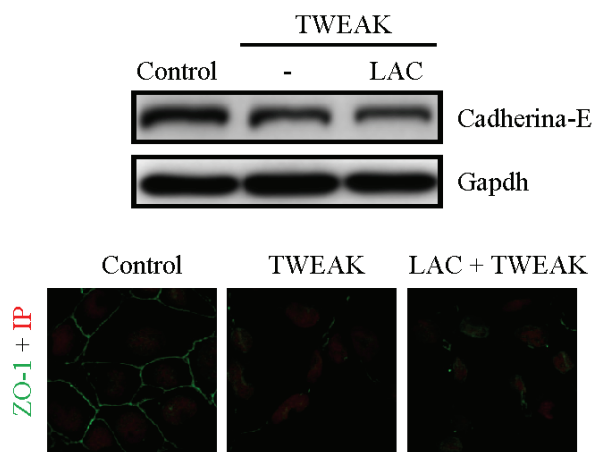
**Figura 19.1. Relaciones entre inflamación y TEM. El NF-κB es un mediador de la TEM inducida por TWEAK en células tubulares.** A-C) La inhibición de la activación de NF-κB resultó en la moderación de la TEM inducida por TWEAK a las 48 horas. Las células MCT fueron tratadas con 100 ng/ml de TWEAK o pretratadas con 1 μM de Bay 11-708 (Bay, inhibidor de NF-κB) durante 60 minutos antes de la adición de TWEAK durante 48 horas. **A)** Análisis de la expresión de cadherina-E mediante WB. Experimento representativo y la correspondiente cuantificación del set completo de datos representando la media ± SD de 4 experimentos independientes. \*p < 0,02 frente al Control y #p < 0,05 respecto a TWEAK. **B)** Análisis de la expresión de ZO-1 y vimentina mediante microscopía confocal. Aumento original 200x. **C)** Análisis de la expresión génica de HNF1β y cadherina-16 mediante q-RT-PCR. El gráfico mostrado representa la media ± SD de 4 experimentos independientes. \*p < 0,02 frente al Control.

La inhibición farmacológica de NF- $\kappa$ B con un inhibidor de la fosforilación de I $\kappa$ B, Bay 11-7082, inhibió el descenso en la expresión de cadherina-E y ZO-1 y el aumento de expresión de vimentina en respuesta a TWEAK (Figura 19.1. A y B). Sin embargo, el bloqueo del NF- $\kappa$ B no incidió en la síntesis de los genes de HNF1 $\beta$  y cadherina-16 (Figura 19.1.C). En el modelo de UUO, los ratones WT obstruidos mostraron una activación renal del NF- $\kappa$ B, detectado a través de la translocación nuclear de p65, en células tubulares que también expresaron  $\alpha$ SMA (Figura 19.2).



**Figura 19.2. Relaciones entre inflamación y TEM. Activación de NF- $\kappa$ B en ratones WT en el modelo de daño obstructivo UUO.** En los riñones obstruidos de ratones WT durante 7 días, la  $\alpha$ SMA se encontró expresada en túbulo con p65 activado. Las áreas recuadradas de las imágenes superiores son expuestas con un mayor aumento en la serie de imágenes mostradas a la derecha. Las líneas blancas discontinuas delimitan el área de túbulo individuales. Las flechas indican células tubulares individuales con tinción positiva para p65 (verde) junto con localización nuclear de p65 (rojo), indicativo de la activación de NF- $\kappa$ B. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Las imágenes se obtuvieron mediante microscopía confocal. Aumento original 160x.

Finalmente, dado que TWEAK también activa la vía alternativa de NF- $\kappa$ B en células tubulares (Sanz AB, 2010), exploramos el papel de esta ruta sobre la TEM inducida por el tratamiento con TWEAK. En células tubulares, el proteasoma procesa el dímero NF- $\kappa$ B2/p100 para producir p52 activo tras la estimulación con TWEAK (Sanz AB, 2010). El inhibidor del proteasoma Lactacistina previene la expresión de genes dependientes de la ruta no canónica de NF- $\kappa$ B en células MCT (Sanz AB, 2010). Sin embargo, el pretratamiento de estas células con lactacistina no impidió el efecto de TWEAK sobre cadherina-E y ZO-1, lo que sugirió que la ruta alternativa de NF- $\kappa$ B no se encontraría involucrada en la TEM por TWEAK (Figura 19.3).



**Figura 19.3. La ruta de activación alternativa de NF- $\kappa$ B no participa en la regulación de las proteínas de uniones intercelulares.** Las células MCT fueron incubadas con 100 ng/ml de TWEAK durante 48 horas en presencia o ausencia de Lactacistina (LAC, 10  $\mu$ M), añadida 60 minutos antes que TWEAK. Se muestran un WB representativo de cadherina-E (panel izquierdo) e imágenes de microscopía confocal para ZO-1 en verde (panel derecho).

## 2.5. Papel de mediadores proinflamatorios en la TEM inducida por TWEAK en células tubulares: participación de la MAP quinasa ERK1/2

Estudios previos de nuestro grupo han establecido que la cascada de MAPK contribuye a los efectos mitogénicos e inflamatorios de TWEAK tanto en células renales como en el riñón *in vivo* (Sanz AB, 2009). Además, MAPK participa en la TEM tubular en respuesta a estímulos profibróticos (Rhyu DY, 2005; Rodrigues-Díez R, 2008). En células MCT, TWEAK induce la activación de ERK1/2 (Sanz AB, 2009).

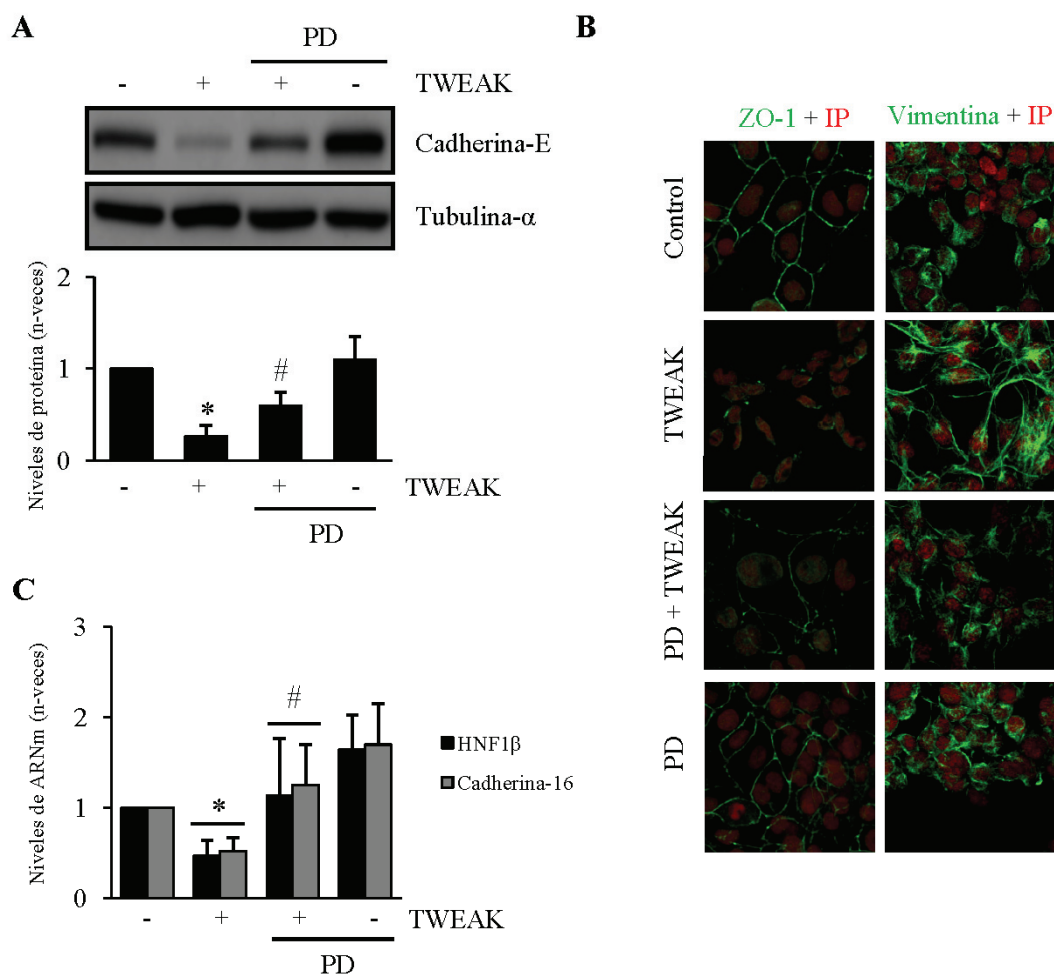
El bloqueo de la activación de ERK1/2 por el inhibidor farmacológico PD98059 impidió la TEM inducida por TWEAK, incluyendo el descenso en la expresión de cadherina-E, ZO-1, HNF1 $\beta$  y cadherina-16 y el aumento en los niveles de vimentina (Figura 20).

## 2.6. La regulación negativa del receptor VDR es un mediador de la TEM inducida por TWEAK en células tubulares

El receptor de la vitamina D (VDR) fue recientemente involucrado en la producción de la TEM inducida por el TNF $\alpha$  (Xiong M, 2012).

Para investigar si VDR estaba involucrado como mediador de las respuestas de TWEAK, estudiamos primeramente sus niveles de expresión en células MCT tratadas con la citoquina. La estimulación con TWEAK redujo significativamente la expresión de VDR a nivel transcripcional a las 3 horas de tratamiento, confirmandose una posterior disminución de sus niveles proteicos a partir de las 8 horas de tratamiento (Figura 21.1. A y B).

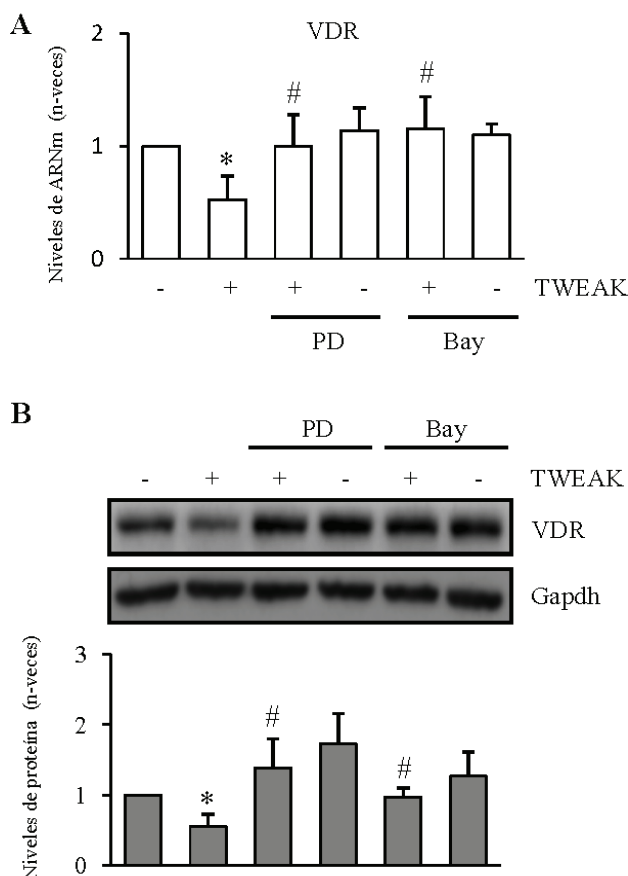




**Figura 20. Relaciones entre inflamación y TEM. La activación de ERK1/2 media la TEM inducida por TWEAK en células tubulares.** A-C) La inhibición de la ERK1/2 resultó en la moderación de la TEM inducida por TWEAK. Las células MCT fueron tratadas con 100 ng/ml de TWEAK o pretratadas con 20 μM de PD98059 (PD, inhibidor de ERK1/2), durante 60 minutos antes de la adición de TWEAK. **A)** WB representativo del análisis de la expresión de cadherina-E. El gráfico de barras muestra los datos de la media ± SD de 4 experimentos independientes. \* $p < 0,02$  frente al Control y # $p < 0,05$  respecto a TWEAK. **B)** Imágenes representativas obtenidas mediante microscopía confocal de la expresión de ZO-1 y vimentina. Aumento original 200x. **C)** Análisis de la expresión génica de HNF1β y cadherina-16 mediante q-RT-PCR. El gráfico mostrado representa la media ± SD de 4 experimentos independientes. \* $p < 0,02$  frente al Control y # $p < 0,05$  respecto a TWEAK.

El descenso de los niveles de VDR fue dependiente de la activación de ERK y NF-κB ya que el pretratamiento con los inhibidores PD98059 y Bay 11-7082 restituyó de modo significativo los niveles de expresión del receptor (Figura 21.1. A y B). De acuerdo con este resultado, el silenciamiento de VDR resultó en un descenso en la expresión de cadherina-E, denotando que VDR contribuye a la estabilización de cadherina-E en células en reposo (Figura 21.2.A). El tratamiento con paricalcitol, un conocido estimulador de la síntesis y señalización por VDR, incrementó los niveles de VDR en las células tubulares (Figura 21.2.B). Concomitantemente, el paricalcitol previno la pérdida de cadherina-E inducida por el tratamiento con TWEAK (Figura 21.2.B). Sin embargo, el pretratamiento con paricalcitol no modificó los cambios producidos

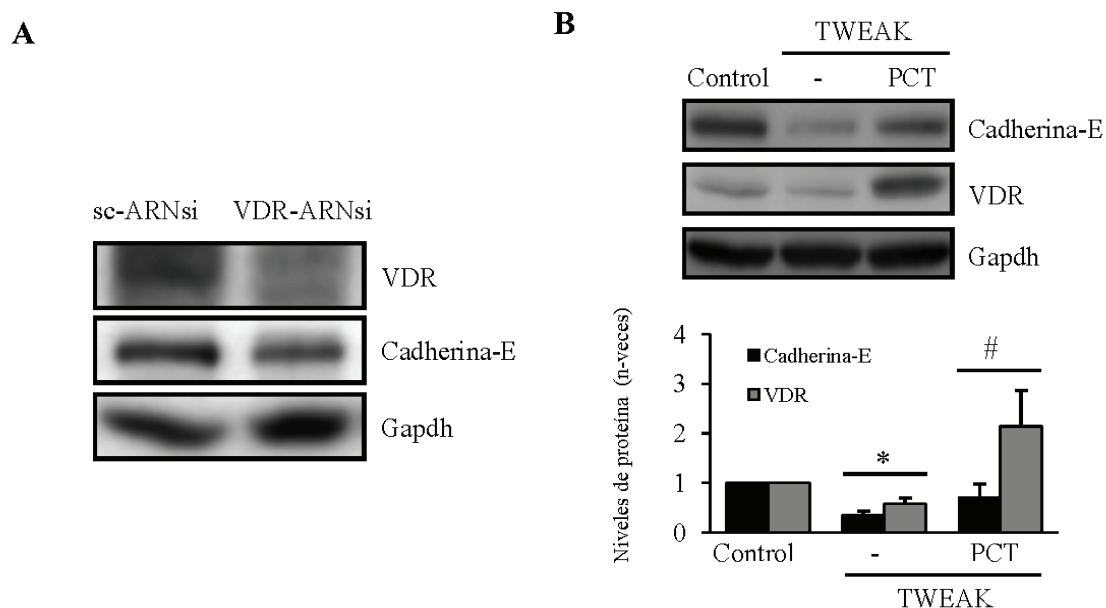
por TWEAK en la transcripción de HNF1 $\beta$  y cadherina-16, sugiriendo que la regulación de la expresión de estas dos moléculas se encuentra bajo el control de ERK pero no de VDR (Figura 21.3.A).



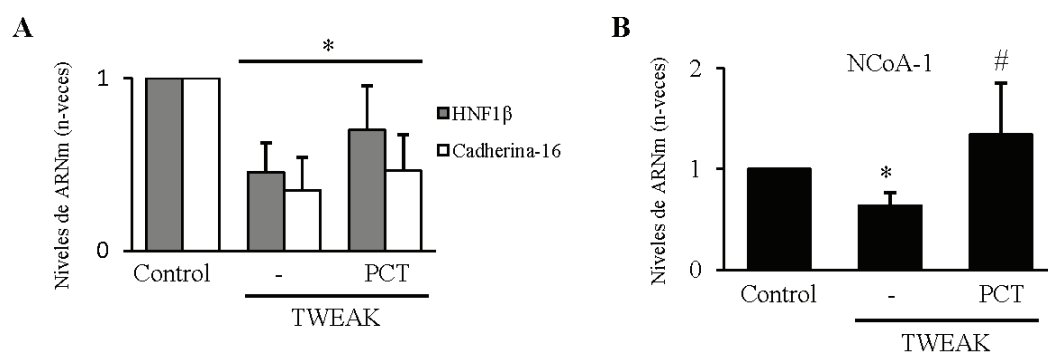
**Figura 21.1. TWEAK reprime la expresión del receptor de la vitamina D (VDR) en células tubulares de manera dependiente de la activación de NF- $\kappa$ B y ERK1/2.** Las células MCT fueron tratadas con 100 ng/ml de TWEAK durante 3 horas (**A**) y 8 horas (**B**) en presencia o ausencia de los inhibidores de NF- $\kappa$ B (Bay 11-708, Bay) y de ERK1/2 (PD98059, PD) adicionados al cultivo en las mismas condiciones especificadas en las figuras 19 y 20. **A)** TWEAK reduce la expresión génica de VDR y la inhibición de NF- $\kappa$ B o ERK1/2 impide este efecto. La gráfica de barras muestra el análisis de la expresión génica de VDR cuantificada mediante q-RT-PCR. Media  $\pm$  SD de 4 experimentos independientes. \* $p < 0,02$  frente al Control y # $p < 0,05$  respecto a TWEAK. **B)** TWEAK reduce la expresión de la proteína VDR y la inhibición de NF- $\kappa$ B o ERK1/2 evita este efecto. La figura muestra un WB representativo de un conjunto de 3 experimentos independientes y su correspondiente cuantificación representada como la media  $\pm$  SD. \* $p < 0,05$  frente al Control y # $p < 0,05$  respecto a TWEAK.

Además, TWEAK también inhibió la expresión génica de NCoA-1, un coactivador de VDR, y paricalcitol previno este efecto (Figura 21.3.B). Este último resultado sugiere la participación de NCoA-1 como un factor necesario en la regulación de cadherina-E dependiente de VDR.

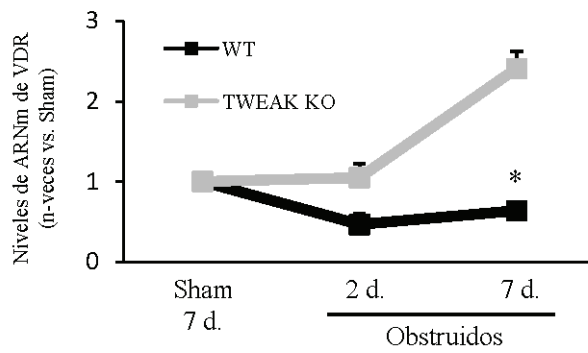
Estos resultados muestran que VDR contribuye a la estabilización de la cadherina-E en células tubulares, y a la inversa, sugieren que la pérdida de VDR puede contribuir a promover la TEM. En el modelo UUO, los ratones WT obstruidos exhibieron un descenso en los niveles transcripcionales de VDR, mientras que en los ratones TWEAK KO, los niveles de expresión de VDR fueron similares o aun mayores a los exhibidos por los animales del grupo Sham control (Figura 21.4).



**Figura 21.2. La pérdida de expresión de VDR es un mediador de la TEM inducida por TWEAK.** **A)** El VDR contribuye a estabilizar la expresión de cadherina-E. Las células MCT se transfectaron con un ARNsi de control (sc-ARNsi) o con un ARNsi específico de VDR (VDR-ARNsi) y tras 72 horas de transfección se analizaron los niveles de expresión de cadherina-E y VDR mediante WB. Se muestran imágenes representativas de 3 experimentos independientes. **B)** El tratamiento con paricalcitol (PCT) impide el descenso de la expresión génica de VDR y cadherina-E inducido por TWEAK. Las células MCT fueron pretratadas con paricalcitol (50 µg/ml) durante 24 horas antes de la adición al medio de TWEAK (100 ng/ml) durante 48 horas. La figura muestra un ensayo WB representativo de un conjunto de 4 experimentos independientes llevados a cabo para evaluar los niveles proteicos de cadherina-E y VDR y su correspondiente cuantificación representada como media  $\pm$  SD. \* $p < 0,02$  frente a Control y <sup>#</sup> $p < 0,05$  respecto a TWEAK.



**Figura 21.3. El aumento de VDR provocado por el paricalcitol regula de modo diferencial el comportamiento de genes asociados a la TEM inducida por TWEAK.** **A)** Análisis transcripcional de la expresión de HNF1β y de cadherina-16 analizados mediante q-RT-PCR en células MCT tratadas con TWEAK durante 24 horas, en presencia o ausencia de paricalcitol (PCT) (mismas condiciones que en la figura 16). \* $p < 0,05$  respecto al Control.  $n=3$ . **B)** Análisis transcripcional de la expresión de NCoA-1 mediante q-RT-PCR en células MCT tratadas como en A. La figura representa la media  $\pm$  SD de 4 experimentos independientes. \* $p < 0,02$  frente al Control y <sup>#</sup> $p < 0,05$  respecto a TWEAK.

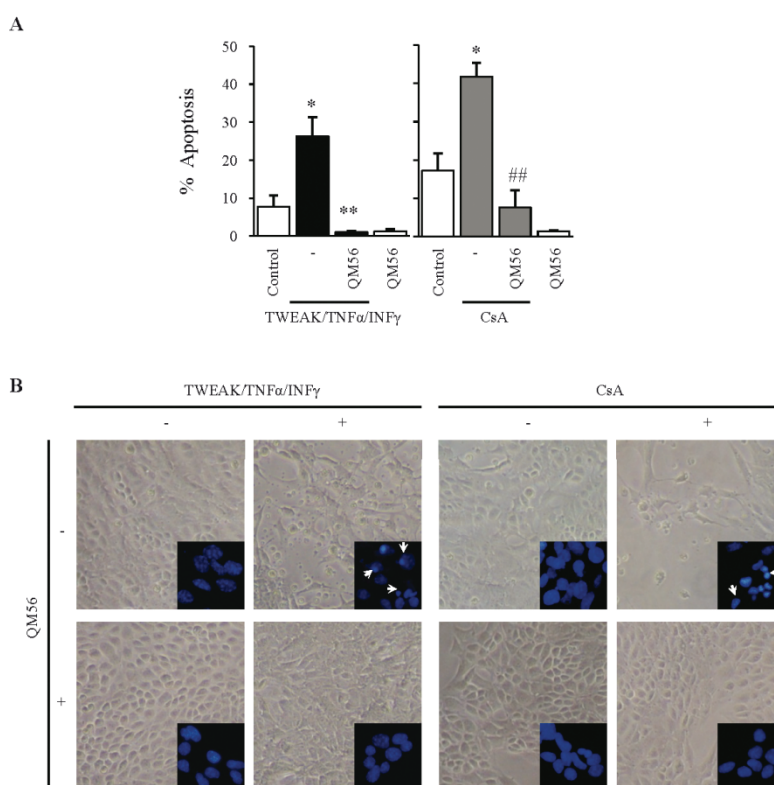


**Figura 21.4. TWEAK es necesario para reprimir la expresión de VDR en un modelo UUO.** Los niveles transcripcionales del VDR disminuyen en los riñones obstruidos de ratones WT, mientras que ese efecto es prevenido en los riñones obstruidos de ratones TWEAK KO. Los niveles de ARNm fueron analizados mediante q-RT-PCR a los 2 y 7 días posteriores la obstrucción. \*p < 0,05 respecto al grupo Sham.

### Parte III: Estudio de los mecanismos de acción de la nanomedicina polimérica QM56 en la prevención del daño renal inducido por inhibidores de calcineurina y TWEAK

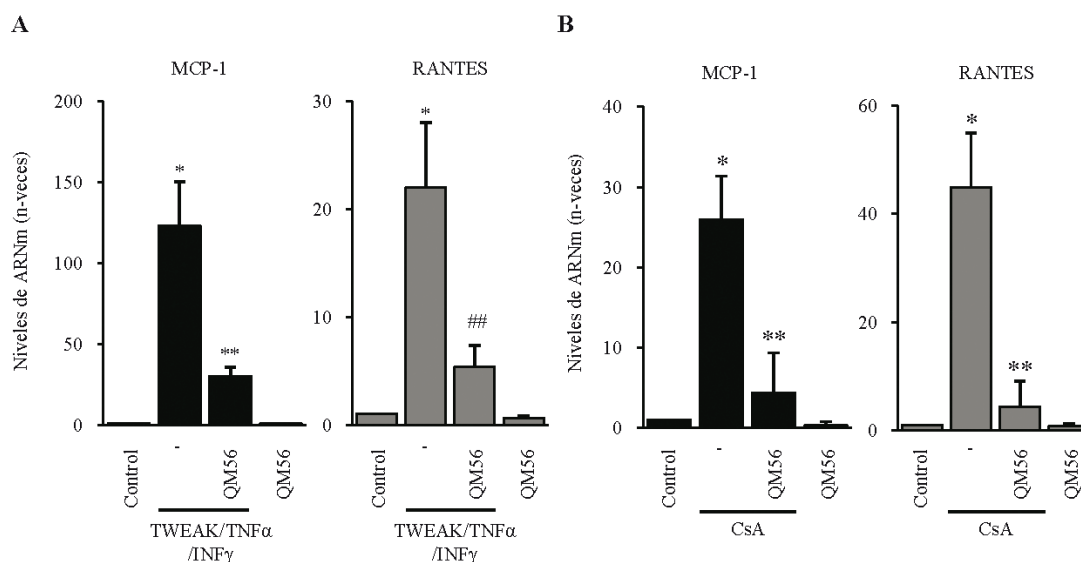
#### 3.1. QM56 inhibe la apoptosis y reduce la expresión de quimioquinas producidas por citoquinas proinflamatorias y por ciclosporina A en células tubulares renales

De modo similar a las nefrotoxinas, las citoquinas proinflamatorias de la superfamilia de TNF pueden inducir daño tubular y muerte celular (Justo P, 2003; Justo P, 2006; Sánchez-Niño MD, 2010). Es conocido también que el daño tisular puede generar inflamación a través de múltiples mecanismos (Strutz F & Muller GA, 1999). Así, el daño del tejido renal conduce a inflamación y a su vez, esta puede promover el daño tisular.



**Figura 22.1. El QM56 protege a las células tubulares de la apoptosis inducida por citoquinas y por la CsA. A-** Las células MCT fueron coestimuladas con una combinación de TWEAK (100 ng/ml), TNF $\alpha$  (30 ng/ml) e IFN $\gamma$  (30 U/ml) durante 24 horas o con CsA (10  $\mu$ g/ml) durante 48 horas. El QM56 (10  $\mu$ M) fue añadido 60 minutos antes que los tratamientos con las citoquinas o con la CsA. **A)** La detección y cuantificación de la apoptosis se realizó mediante análisis del ciclo celular por citometría de flujo. La población con menor contenido de DNA (subG1) se definió como apoptótica. Los resultados del gráfico representan los datos obtenidos en 4 ensayos independientes. \* $p < 0.01$  frente al valor Control, \*\* $p < 0.01$  contra TWEAK/TNF $\alpha$ /TNF $\gamma$  y ## $p < 0.05$  respecto al valor del tratamiento CsA. **B)** La apoptosis se evaluó mediante el análisis de la morfología celular por microscopía de contraste de fase y por la fragmentación nuclear detectada por microscopía de fluorescencia con tinción nuclear con DAPI fluorescente mostrada como imágenes insertadas. En estas, las flechas blancas señalan células apoptóticas que presentan núcleos reducidos, picnóticos y fragmentados, característicos de este proceso.

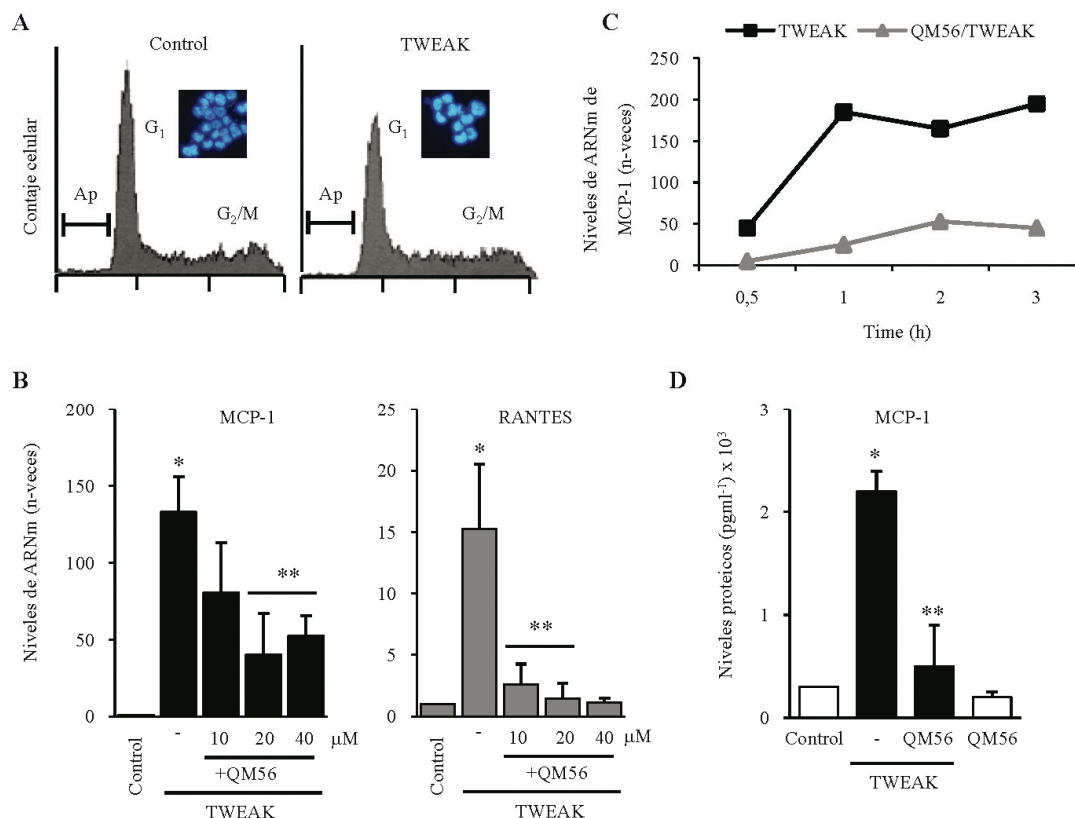
La nefrotoxina CsA y la citoquina TWEAK en combinación con TNF $\alpha$  e INF $\gamma$  (TWEAK/TNF $\alpha$ /INF $\gamma$ ), son estímulos inductores de muerte celular cuyos mecanismos han sido estudiados en nuestro laboratorio. Mientras que el tratamiento con TWEAK/TNF $\alpha$ /INF $\gamma$  activa la ruta extrínseca de apoptosis a expensas de la interacción de TWEAK con su receptor Fn14 y posterior activación de caspasa 8, la CsA actúa directamente sobre la mitocondria activando de este modo la ruta intrínseca de apoptosis (Justo P, 2003; Justo P, 2006).



**Figura 22.2. QM56 previene la expresión de quimioquinas inducida por CsA y por coestimulación con citoquinas proinflamatorias. A-B)** Análisis, mediante PCR cuantitativa en tiempo real de los niveles de expresión génica del mensajero de las quimioquinas MCP-1 y RANTES en células MCT expuestas a: TWEAK/TNF $\alpha$ /INF $\gamma$  durante 3 horas. \* $p < 0,01$  frente a valor Control, \*\* $p < 0,05$  y \*\*\* $p < 0,01$  respecto a TWEAK/TNF $\alpha$ /INF $\gamma$  (A) o CsA durante 6 horas. \* $p < 0,05$  contra valor Control y \*\* $p < 0,05$  frente a CsA (B). Datos de 5 ensayos independientes expresados como media  $\pm$  SD.

Con el objetivo de probar la acción de QM56, un nanoconjugado polimérico inhibidor de Apaf-1 y por tanto con efecto antiapoptótico, cultivos de células MCT fueron tratados con TWEAK/TNF $\alpha$ /INF $\gamma$  o CsA en presencia o ausencia de QM56 durante 24 horas y el porcentaje de células apoptóticas valorado mediante citometría de flujo y análisis del ciclo celular. De acuerdo a lo esperado, QM56 redujo significativamente la apoptosis producida por ambos estímulos, reduciendo el porcentaje de células con menor contenido de ADN (población sub-G1) en las células tratadas con el inhibidor en relación a los controles (Figura 22.1.A). Experimentos adicionales de tinción nuclear con DAPI fluorescente seguido de la observación microscópica, confirmaron que QM56 evitó la fragmentación nuclear dependiente de caspasas e indicativa de la ocurrencia de apoptosis (Figura 22.1.B). Seguidamente, se decidió estudiar si QM56 podría tener efectos sobre la respuesta inflamatoria provocada por ambos estímulos apoptóticos. Las células MCT se trataron nuevamente con TWEAK/TNF $\alpha$ /INF $\gamma$  o con CsA durante 3 horas, en presencia o ausencia de QM56, analizándose posteriormente el perfil de

expresión de las quimioquinas MCP-1 y RANTES mediante q-RT-PCR. Los resultados indicaron que mientras ambos tratamientos indujeron la síntesis de MCP-1 y RANTES, QM56 la inhibió significativamente (Figura 22.2. A y B).



**Figura 23. QM56 previene la expresión de mediadores de la inflamación inducida por TWEAK.** **A)** El tratamiento con TWEAK (100 ng/ml) durante 24 horas no produce apoptosis (Ap) en células MCT. En la figura se muestran los histogramas del contenido de ADN de las distintas poblaciones del ciclo celular e imágenes obtenidas con microscopía de fluorescencia de núcleos teñidos con DAPI de células MCT dejadas sin tratar o tratadas con TWEAK. **B)** El efecto antiinflamatorio de QM56 es dependiente de la dosis. Análisis de la expresión génica de MCP-1 y RANTES por q-RT-PCR en células tubulares estimuladas con TWEAK, en presencia o ausencia de dosis variables de QM56. Media  $\pm$  SD de los datos de 3 experimentos independientes. \* $p < 0,05$  contra Control y \*\* $p < 0,05$  respecto a TWEAK. **C)** El QM56 impide la transcripción temprana de MCP-1. Cultivos de células MCT se incubaron con TWEAK (100 ng/ml) durante los tiempos indicados en presencia o ausencia de QM56 (20  $\mu$ M), seguidos del análisis de la expresión génica de MCP-1 a diferentes tiempos. El gráfico expresa los datos de un ensayo representativo. **D)** El QM56 inhibe la síntesis proteica del MCP-1 inducido por el tratamiento con TWEAK. Las células se trataron de forma similar que en C durante 3 horas. Al término del tratamiento, se recogieron los sobrenadantes y los niveles de la proteína MCP-1 se midieron por ELISA. \* $p < 0,05$  frente a valor Control y \*\* $p < 0,05$  respecto a TWEAK;  $n=3$ .

### 3.2. QM56 evita el aumento de expresión de quimioquinas inducido por TWEAK en ausencia de apoptosis

Dado el carácter antiapoptótico del QM56, seguidamente se estudió si los efectos observados sobre la expresión de quimioquinas podían tener relación con este efecto. El aumento de la

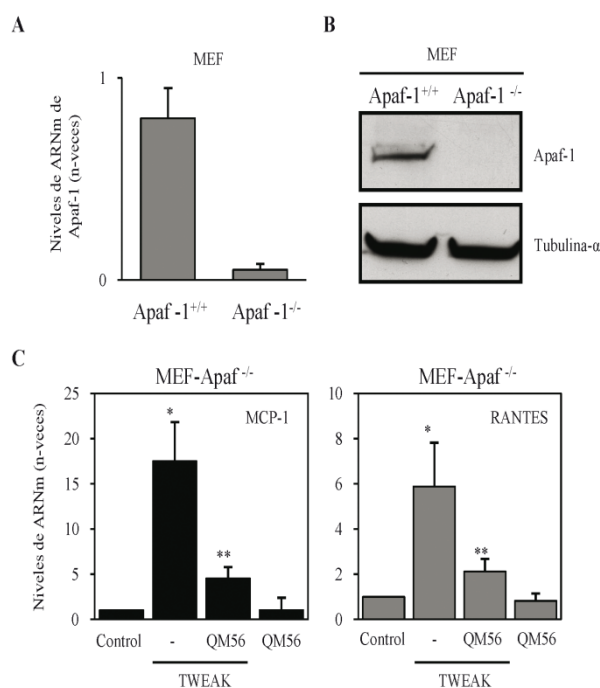


expresión de MCP-1 y RANTES se produjo a tiempos muy iniciales del tratamiento con los inductores, lo que sugería que los efectos de QM56 sobre la síntesis de factores proinflamatorios podrían ser independientes de sus acciones antiapoptóticas observadas a tiempos más tardíos. Para investigar esta posibilidad, se decidió tratar a las células con la citoquina TWEAK, dada su capacidad de promover la inflamación sin afectar la viabilidad celular (Justo P, 2006; Sanz AB, 2008). De esta manera se podrían diferenciar efectos de QM56 relacionados con apoptosis de aquellos relacionados con inflamación. La ausencia de muerte celular apoptótica en células MCT tratadas con TWEAK durante 24 horas, fue corroborada mediante citometría de flujo y confirmada mediante tinción nuclear con DAPI fluorescente (Figura 23.A). En este sistema, en ausencia de muerte celular, QM56 previno el aumento de la expresión de ARN mensajero de MCP-1 y RANTES inducido por TWEAK, de manera dependiente de la concentración y del tiempo (Figura 23. B y C). Además, mediante ELISA comprobamos que el pretratamiento con QM56 redujo los niveles de MCP-1 en los sobrenadantes celulares provenientes de estos mismos tratamientos (Figura 23.D).

Estos resultados indicaron una clara disociación entre los efectos antiapoptóticos y antiinflamatorios de TWEAK.

### 3.3. QM56 inhibe la respuesta inflamatoria en células deficientes en Apaf-1

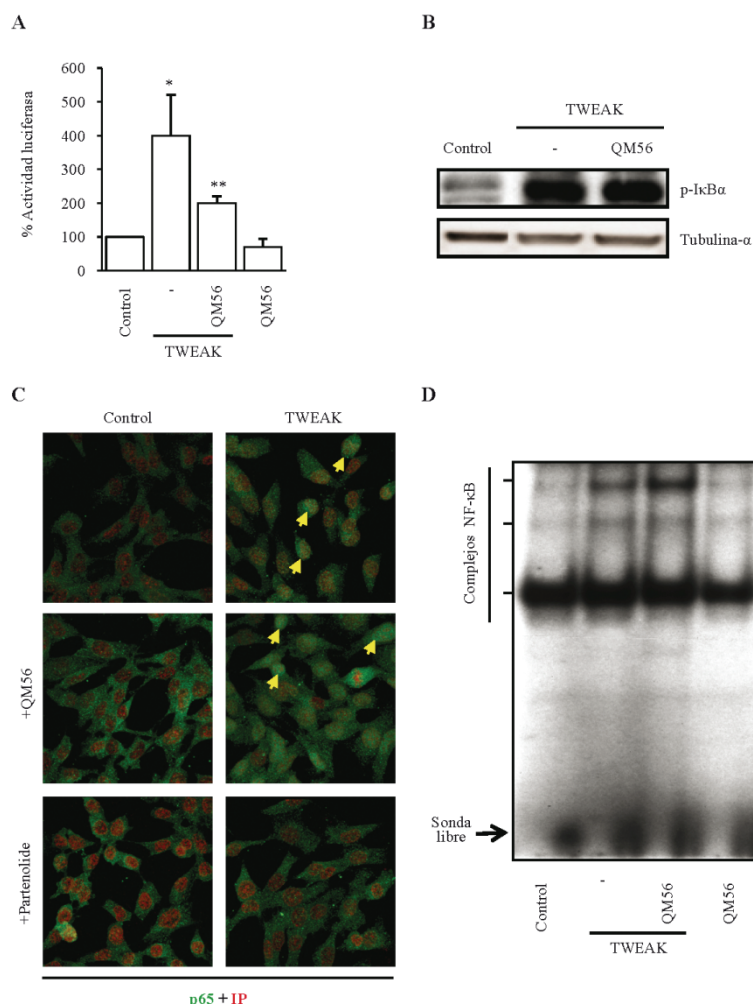
Para investigar si la acción antiinflamatoria de QM56 era dependiente de su capacidad para inhibir Apaf-1, se utilizó una línea celular de fibroblastos embrionarios deficientes en esta proteína (MEF-Apaf-1<sup>-/-</sup>) y por lo tanto, no respondedores a la apoptosis (Cecconi F, 1998).



**Figura 24. El QM56 bloquea el aumento de expresión de MCP-1 y RANTES dependiente de TWEAK en células deficientes en Apaf-1.** **A)** Análisis de la expresión génica de Apaf-1 en células MEF deficientes en Apaf-1 (MEF-Apaf<sup>-/-</sup>) o *wild type* (MEF-Apaf-1<sup>+/+</sup>). **B)** Análisis mediante WB de los niveles de expresión de la proteína Apaf-1 en células MEF-Apaf<sup>-/-</sup> y MEF-Apaf-1<sup>+/+</sup>. **C)** Las células MEF-Apaf<sup>-/-</sup> fueron incubadas con TWEAK (100 ng/ml), en presencia o ausencia de QM56 (20 μM), durante 3 horas. A continuación, se midieron por PCR cuantitativa en tiempo real, los niveles de ARN mensajero de MCP-1 y RANTES. Los datos graficados pertenecen a 4 experimentos. \*p < 0,01 frente a valor Control y \*\*p < 0,01 respecto a TWEAK.



En primer lugar, mediante ensayos de q-RT-PCR y WB se verificó la ausencia de expresión de Apaf-1 en las células MEF-Apaf-1<sup>-/-</sup> (Figura 24, A y B). Posteriormente, en cultivos de células MEF-Apaf-1<sup>-/-</sup> sometidos a estimulación con TWEAK durante 3 horas, se observaron aumentos en la expresión génica de MCP-1 y RANTES, que fueron impedidos por el pretratamiento de las células con QM56 (Figura 24.C).



**Figura 25. En los tratamientos con TWEAK, QM56 previene la transcripción de quimioquinas dependientes de NF-κB mediante la inhibición de la actividad transcripcional sin afectar su translocación nuclear e interacción con el ADN.** Para todos los experimentos, el TWEAK fue utilizado a una concentración de 100 ng/ml y el QM56 a 20 μM. **A)** El QM56 impide la actividad transcripcional del NF-κB en tratamientos con TWEAK. La figura muestra la actividad transcripcional de NF-κB medida con un ensayo de gen reportero llevado a cabo en células MCT tratadas con TWEAK o cotratadas con QM56. La actividad transcripcional es expresada como porcentaje de actividad luciferasa normalizada con la actividad Renilla. Datos de 3 experimentos independientes. \*p < 0,01 frente a valor Control y \*\*p < 0,05 frente a TWEAK. **B)** TWEAK incrementa la fosforilación de IκBα después de 30 minutos de tratamiento y el QM56 no impide este efecto. Se muestra una imagen representativa de 3 ensayos de WB independientes. **C)** El QM56 no impide la translocación nuclear de p65. Las células se trataron con TWEAK solo o en presencia de QM56 o partenolide durante 30 minutos y el p65 se detectó mediante microscopía confocal. En verde se muestra la fluorescencia específica y en rojo los núcleos teñidos con IP. Las flechas amarillas señalan células que muestran la translocación nuclear de la subunidad p65. **D)** El QM56 no evita la unión del NF-κB al ADN. EMSA representativo de extractos de proteínas nucleares obtenidos de células MCT incubadas con los estímulos indicados durante 30 minutos.

Este resultado demostró que la inhibición de la respuesta inflamatoria por parte de QM56 no es dependiente de la interacción del peptido bioactivo con Apaf-1.

### **3.4. QM56 previene la actividad transcripcional dependiente de NF- $\kappa$ B sin afectar su translocación y unión al ADN**

El efecto proinflamatorio de TWEAK en células tubulares, está mediado por la activación de NF- $\kappa$ B (Sanz AB, 2008). A este respecto, el inhibidor de la degradación de I $\kappa$ -B $\alpha$ , Partenolide (Hehner SP, 1999), previene la translocación nuclear de p65/RelA, su posterior unión al ADN y actividad transcripcional inducidas por TWEAK (Sanz AB, 2008). Dado que las respuestas proinflamatorias dependientes de NF- $\kappa$ B fueron inhibidas por QM56, se estudiaron los efectos del mismo sobre la secuencia de eventos activadores de este factor de transcripción.

Primeramente se observó que QM56 no evitó la fosforilación de I $\kappa$ -B $\alpha$  ni la consecuente translocación nuclear de p65/RelA provocada por TWEAK (Figuras 25. B y C). Además, mediante ensayos de retraso de la movilidad electroforética (EMSA) comprobamos que QM56 no impidió la unión de NF- $\kappa$ B al ADN (Figura 25.D). Sin embargo, mediante ensayos de gen reportero observamos que las células MCT estimuladas con TWEAK presentaron una mayor actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B, que fue reducida significativamente en presencia de QM56 (Figura 25.A).

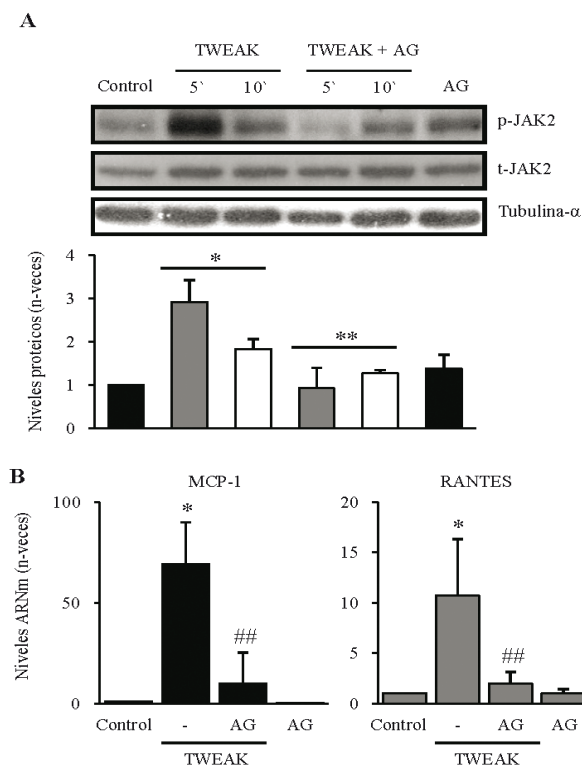
Estos ensayos sugirieron que los efectos antiinflamatorios de QM56 podrían estar circunscriptos a la fase regulatoria de la transcripción, normalmente controlada por modificaciones postraduccionales del NF- $\kappa$ B (Hayden MS & Ghosh S, 2008).

### **3.5. La inhibición de JAK2 previene el aumento de los niveles de mensajero de quimioquinas inducido por TWEAK**

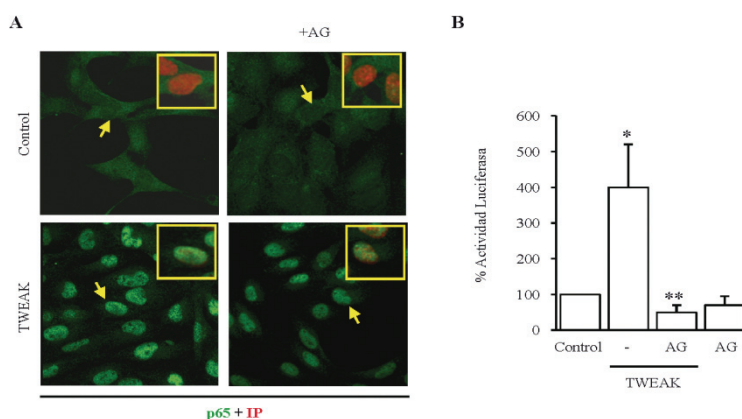
La fosforilación de proteínas interviene en múltiples pasos de la transducción de señales y en la regulación génica. La ruta JAK/STAT es un importante mediador de la inflamación y el daño renal (Ghoreschi K, 2009; Neria F, 2009).

En células MCT, demostramos mediante WB que TWEAK induce la fosforilación tanto de JAK2 como de uno de sus sustratos, el factor de transcripción STAT3, y que ambos efectos fueron impedidos por la inhibición química de JAK2 con AG490 (Figura 26.1.A). Además, mediante q-RT-PCR, se comprobó que la inhibición de la ruta JAK2/STAT3 con AG490 previno la síntesis de quimioquinas inducida por TWEAK (Figura 26.1.B). De forma similar a

los resultados obtenidos con QM56, la inhibición de la activación de JAK2 con AG490 no interfirió con la translocación nuclear de p65/RelA dependiente de TWEAK (Figura 26.2.A) pero sí reprimió la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B medida en el ensayo con gen reportero (Figura 26.2.B). Además, el AG490 previno el aumento de expresión de MCP-1 y RANTES inducido por TWEAK en células MEF-Apaf-1<sup>-/-</sup> (Figura 26.3).

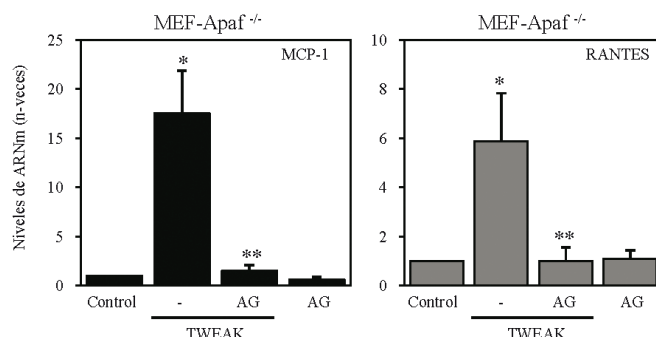


**Figura 26.1. La inhibición de JAK2 regula la síntesis de quimioquinas dependientes de TWEAK.** **A)** Análisis de los niveles de fosforilación de JAK2 mediante WB en células MCT incubadas con TWEAK (100 ng/ml) durante los tiempos indicados, en presencia o ausencia del inhibidor AG490 (AG, 50  $\mu$ M). En el panel inferior se expresan los resultados como la media  $\pm$  SD de 3 experimentos independientes. \* $p < 0,05$  respecto al valor del tratamiento Control y \*\* $p < 0,05$  frente a TWEAK. **B)** Niveles de expresión génica de MCP-1 y RANTES en células tubulares tratadas con TWEAK durante 3 horas o preincubadas con AG490 durante 60 minutos y después tratadas con TWEAK. La gráfica representa la media  $\pm$  SD de todos los valores obtenidos en 3 ensayos independientes. \* $p < 0,01$  frente al valor del Control y ### $p < 0,01$  contra TWEAK.



**Figura 26.2. La inhibición de JAK2 no impide la translocación nuclear de p65 y reprime la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B en los tratamientos con TWEAK.** Para todos los experimentos, el TWEAK fue utilizado a una concentración de 100 ng/ml y el QM56 a 20  $\mu$ M. **A)** Las células MCT fueron preincubadas con AG490 (AG) durante 60 minutos y luego tratadas con TWEAK durante 30 minutos. Como control se utilizaron células sin tratar o tratadas con AG. La translocación de la subunidad p65 se evaluó mediante microscopía confocal (fluorescencia verde). Los núcleos se tiñeron con IP (fluorescencia roja). Las flechas amarillas señalan células que se muestran amplificadas en las imágenes mostradas como insertos. **B)** La inhibición de JAK2 con AG490 impide la actividad transcripcional del NF- $\kappa$ B. El ensayo se llevó a cabo en las mismas condiciones que el experimento de la figura 20.A, utilizando AG490 en lugar de QM56. \* $p < 0,01$  frente a valor Control y \*\* $p < 0,01$  respecto a TWEAK.

La similitud entre los efectos de AG490 y QM56 sugería que QM56 podría inhibir la actividad de la proteína quinasa JAK2, por lo que seguidamente se evaluó esta hipótesis.



**Figura 26.3. La inhibición de JAK2 con AG490 previene la expresión génica de MCP-1 y RANTES estimulada por TWEAK en células MEF deficientes en Apaf-1.** Análisis, mediante q-RT-PCR, de los niveles de ARN mensajero que presentan células MEF-Apaf<sup>-/-</sup> incubadas con TWEAK (100 ng/ml) durante 3 horas en presencia o ausencia de AG490 (AG). Los datos mostrados en el gráfico pertenecen a 3 experimentos. \*p < 0,01 respecto a Control y \*\*p < 0,01 frente a TWEAK.

### 3.6. QM56 evita la activación de la ruta JAK2/STAT3 en células tubulares y en MEF deficientes en Apaf-1

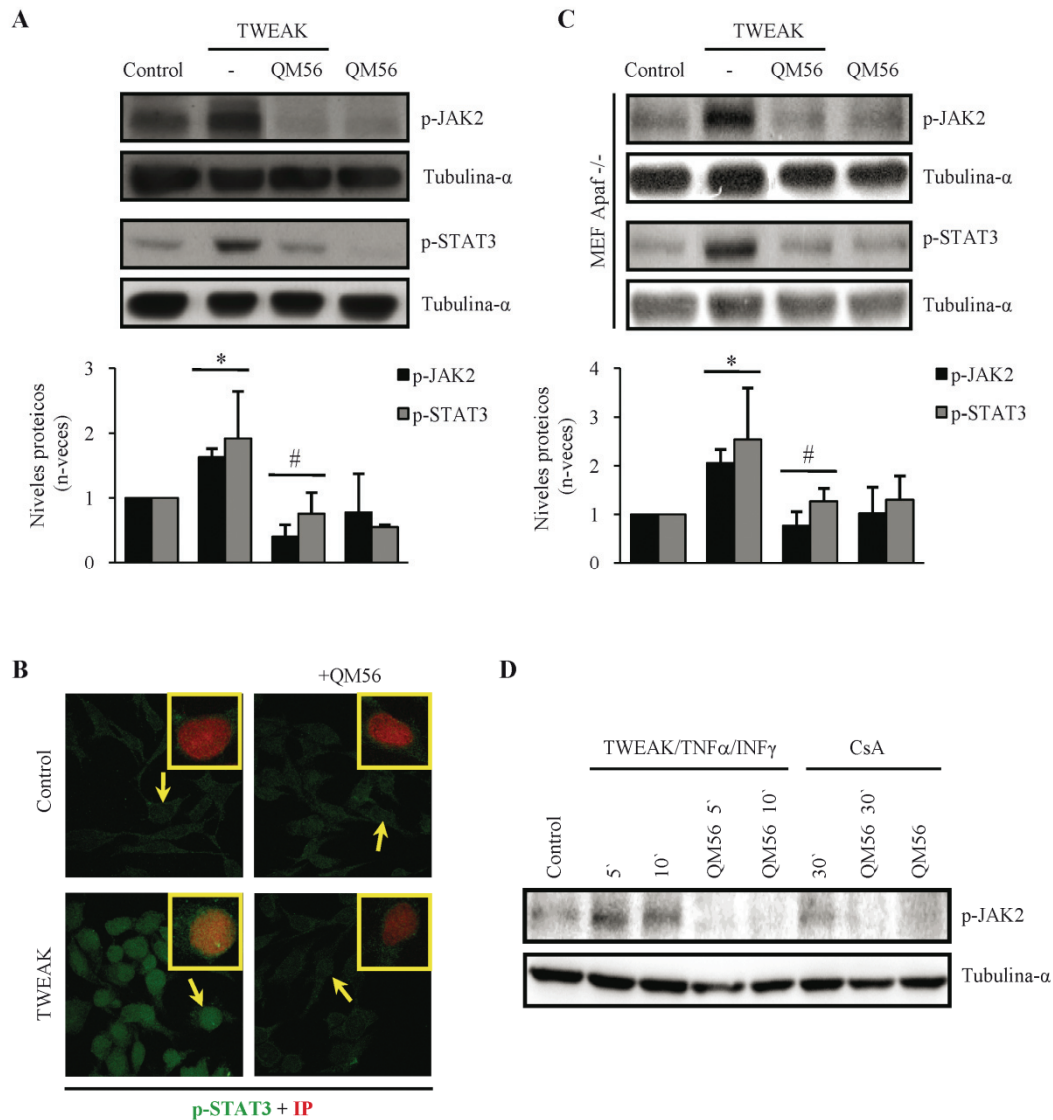
La acción inhibitoria de QM56 sobre la activación de la ruta JAK2/STAT3 dependiente de TWEAK se estudió en células MCT y MEF-Apaf-1<sup>-/-</sup> tratadas con la citoquina, en presencia o ausencia de QM56. En ambas líneas celulares, el tratamiento con el nanoconjugado redujo el nivel de fosforilación de ambas proteínas y evitó la translocación al núcleo de la isoforma fosforilada de STAT3 (Figura 27. A-C). Por otro lado, la acción inhibitoria de QM56 sobre la ruta JAK2/STAT3, fue también advertida en células estimuladas con CsA o con el cóctel de citoquinas TWEAK/TNF $\alpha$ /INF $\gamma$  (Figura 27.D).

Estos resultados demostraron que la ruta JAK2/STAT3 activada por TWEAK es inhibida por QM56 de forma independiente a su interacción con Apaf-1.

### 3.7. QM56 interfiere con eventos de fosforilación reguladores de la actividad transcripcional del NF- $\kappa$ B

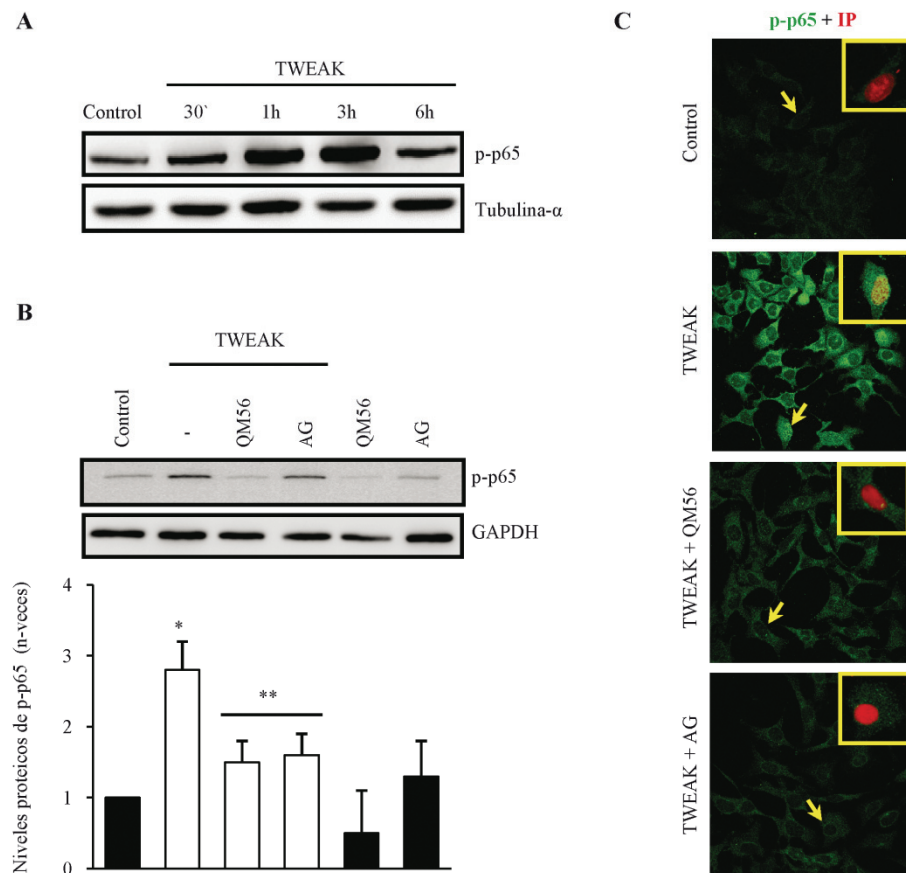
La fosforilación de NF- $\kappa$ B por diversas proteínas quinasas es uno de los principales mecanismos de regulación de la actividad de este factor de transcripción, fundamentalmente por reforzar la interacción del mismo con secuencias específicas de unión al ADN (Hayden MS & Ghosh S,

2008). Entre otros sitios potencialmente fosforilables, la Serina 536 ha sido específicamente relacionada con el control transcripcional de genes inflamatorios (Sasaki CY, 2005; Zhao Y, 2011).



**Figura 27. El QM56 inhibe la activación de la ruta JAK2/STAT3 inducida por TWEAK, TWEAK/TNFα/INFγ y CsA.** Para todos los experimentos, el TWEAK fue utilizado a una concentración de 100 ng/ml y el QM56 a 20 μM. **A)** El QM56 impide la fosforilación de JAK2 y STAT3. Evaluación de las isoformas fosforiladas de JAK2 y STAT3 mediante WB en células MCT estimuladas con TWEAK durante 30 minutos o pretratadas con QM56 durante 60 minutos. En el panel inferior se muestra la representación gráfica de los datos obtenidos mediante densitometría en 3 experimentos similares. \*p < 0,05 frente a Control y #p < 0,05 respecto a TWEAK. **B)** El QM56 impide la translocación de STAT3. Las células se trataron como en A durante 40 minutos y STAT3 fue detectado mediante microscopía confocal (fluorescencia verde). Los núcleos fueron teñidos con IP (fluorescencia roja). Las flechas indican células que se muestran con mayor detalle en los inserts. **C)** Los efectos inhibitorios de QM56 sobre la activación de la ruta JAK2/STAT3 son independientes de la expresión de Apaf-1. El experimento se llevó a cabo en células MEF-Apaf<sup>-/-</sup> en las mismas condiciones que el experimento mostrado en A. \*p < 0,05 respecto a Control y #p < 0,05 frente a TWEAK. **D)** Análisis, por WB, de los niveles de fosforilación de JAK2 en células MCT incubadas con TWEAK/TNFα/INFγ y/o CsA durante los tiempos indicados en ausencia o presencia de QM56.

Mediante WB, observamos que células MCT estimuladas con TWEAK presentaban un mayor nivel de la isoforma de p65 fosforilada en la Serina 536, exhibiendo el pico de fosforilación entre 1 y 3 horas de tratamiento y posterior decrecimiento de la misma (Figura 28.1.A). El cotratamiento de las células con TWEAK y QM56 o AG490, inhibió significativamente la fosforilación de p65 (Figura 28.1.B). Además, mediante microscopía confocal, se evidenció un aumento en los niveles nucleares de p65 fosforilada que también fue inhibido por QM56 y AG490 (Figura 28.1.C).

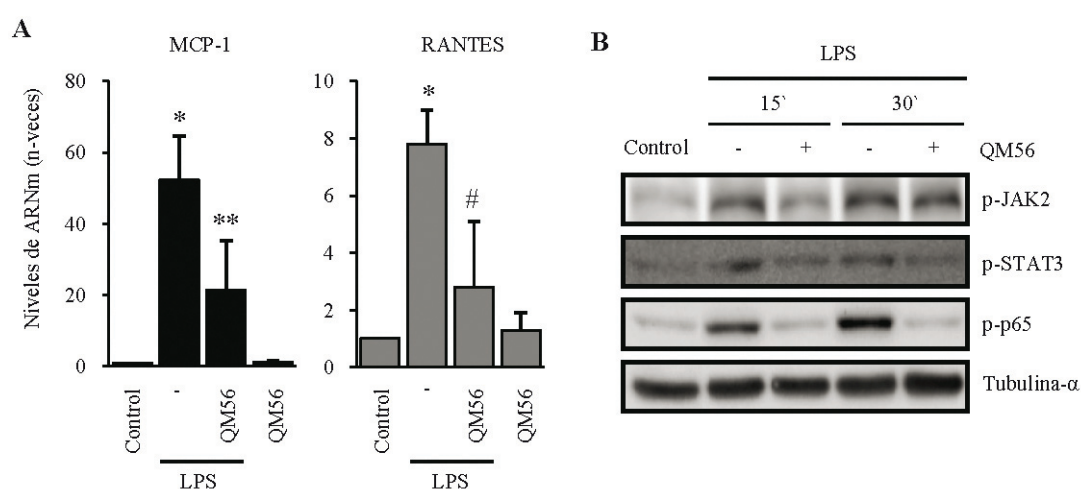


**Figura 28.1. La inhibición de JAK2 y QM56 regula negativamente la fosforilación de p65 inducida por TWEAK.** Para todos los experimentos, el TWEAK fue utilizado a una concentración de 100 ng/ml y el QM56 a 20  $\mu$ M. **A)** Se incubaron células MCT con TWEAK a tiempos variables (de 30 minutos a 6 horas) y los niveles de fosforilación de p65 en la serina 536 se analizaron mediante WB. Se muestra una imagen representativa. **B)** Estudio del contenido en p65 fosforilado que presentan células tubulares tratadas con TWEAK durante 3 horas con o sin la adición de QM56 o AG490 (AG, 50  $\mu$ M). En el panel inferior se muestran los resultados obtenidos en 5 experimentos independientes expresados como la media  $\pm$  SD. \* $p < 0,01$  frente a Control y \*\* $p < 0,05$  respecto a TWEAK. **C)** Las células fueron tratadas como en B y se estudiaron los niveles y localización celular del p65 fosforilado por microscopía confocal. Las flechas indican células individuales con distinto estado de fosforilación de p65 que se muestran ampliadas para más detalles en los insertos.



Finalmente, para estudiar si los efectos inhibitorios de QM56 sobre la síntesis de quimioquinas y eventos regulatorios de la actividad de NF- $\kappa$ B se producían en forma estímulo dependiente, se incubaron las células tubulares con LPS. Este tratamiento activó la ruta JAK2/STAT3/p-p65 y la consecuente inducción de la expresión de MCP-1 y RANTES, efectos que fueron prevenidos de forma significativa por el QM56 (Figura 28.2. A y B).

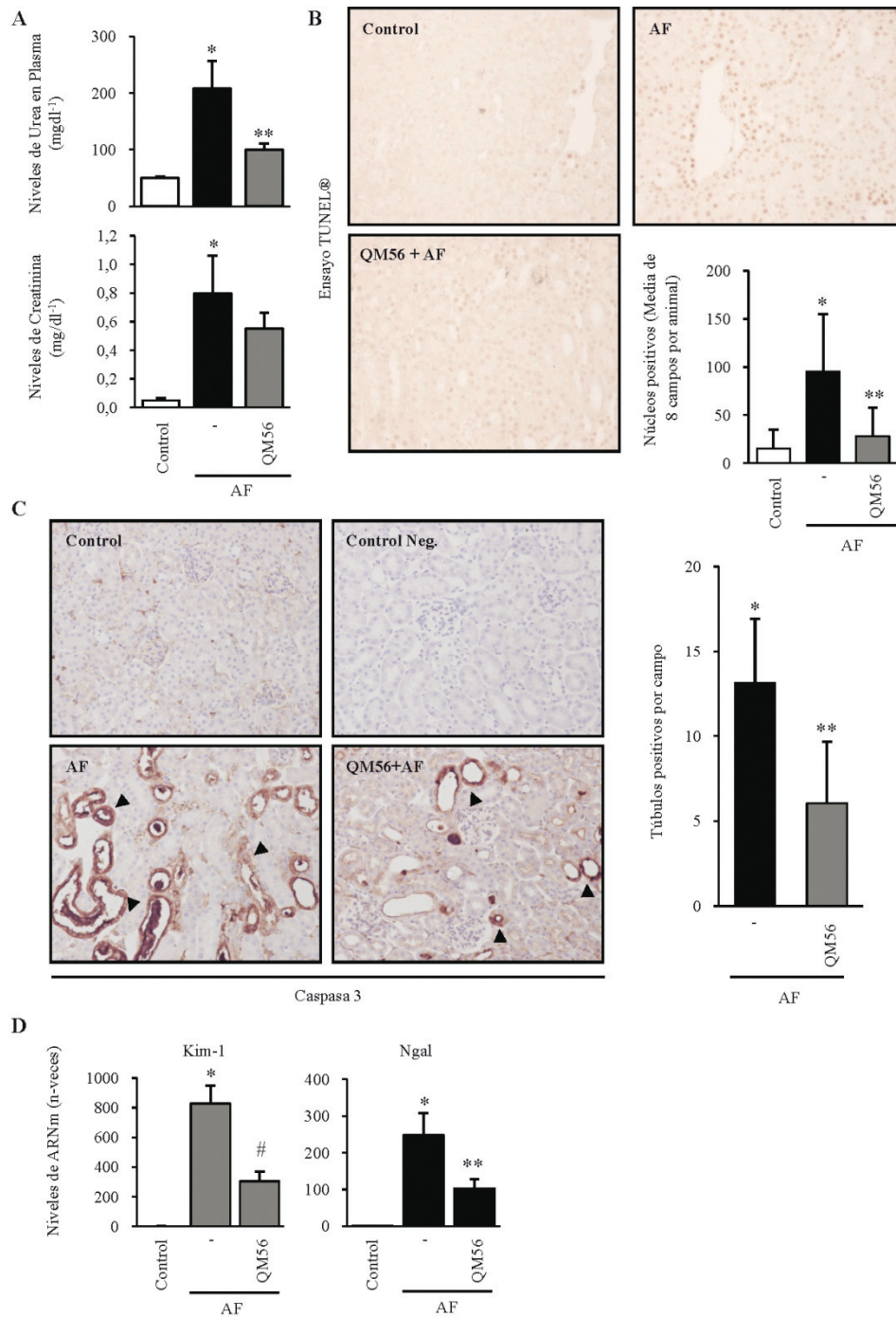
Estos resultados demostraron que la ruta JAK2/STAT3 fosforila la serina 536 de p65 y sugirieron firmemente que QM56 puede interferir con este evento y en consecuencia con la completa activación de la transcripción de quimioquinas proinflamatorias dependiente de NF- $\kappa$ B.



**Figura 28.2. El QM56 es capaz de inhibir tanto la actividad proinflamatoria como la activación de NF- $\kappa$ B inducidas por LPS.** **A)** Niveles de ARN mensajero de MCP-1 y RANTES medidos por PCR cuantitativa en células expuestas a LPS (1  $\mu$ g/ml) durante 3 horas, con el agregado o en ausencia de preincubación con QM56 (20  $\mu$ M). Los resultados pertenecen a 3 ensayos independientes. \* $p < 0,01$  frente al valor Control, \*\* $p < 0,05$  y # $p < 0,02$  respecto a LPS. **B)** Estudio de las isoformas fosforiladas JAK2, STAT3 y p65 evaluadas mediante WB en células estimuladas como en A durante los tiempos indicados. Las imágenes son representativas de 3 experimentos.

### 3.8. QM56 reduce el daño renal en un modelo de fracaso renal agudo

Para evaluar las potenciales implicaciones de la acción de QM56 observada en los cultivos de células tubulares, los efectos del fármaco fueron estudiados en un modelo murino de daño renal agudo provocado por ácido fólico (AF). El daño renal generado de esta manera comparte características patogénicas con la patología renal aguda humana, como la producción de apoptosis y de inflamación (Doi K, 2006; Fang TC, 2005; Ortega A, 2006; Ortiz A, 2000).



**Figura 29.1. El QM56 reduce el grado de daño y disfunción renal en un modelo murino de fracaso renal agudo.** El FRA fue inducido por una única inyección intraperitoneal de ácido fólico (AF) mientras que el QM56 fue inyectado 6 horas antes que el AF por vía intraperitoneal. Los ratones fueron sacrificados 24 horas después del tratamiento con AF. **A)** Análisis de los niveles de Urea y Creatinina plasmáticos. \* $p < 0,01$  frente a Control y \*\* $p < 0,05$  respecto a AF. **B)** Estudio de la apoptosis tubular mediante un ensayo TUNEL®. \* $p < 0,01$  frente a Control y \*\* $p < 0,05$  contra AF. **C)** Inmunohistoquímica de caspasa 3. En cada corte histológico, se cuantificaron los túbulos positivos en un total de 10 campos y el resultado se expresó como el número de túbulos positivos por campo observado con un aumento de 200x. El control de la técnica (Control Neg.) está teñido en ausencia de anticuerpo primario. \* $p < 0,01$  contra el valor del grupo Control y \*\* $p < 0,02$  respecto al grupo AF. **D)** Niveles de expresión génica de Kim-1 y Ngal en extractos totales de riñón cuantificados mediante PCR cuantitativa en tiempo real. \* $p < 0,01$  frente al grupo Control, # $p < 0,01$  y \*\* $p < 0,05$  respecto al grupo AF. En las gráficas se expresan los datos como la media  $\pm$  SD de 8-10 animales por grupo. Las imágenes se adquirieron con un aumento de 200x.

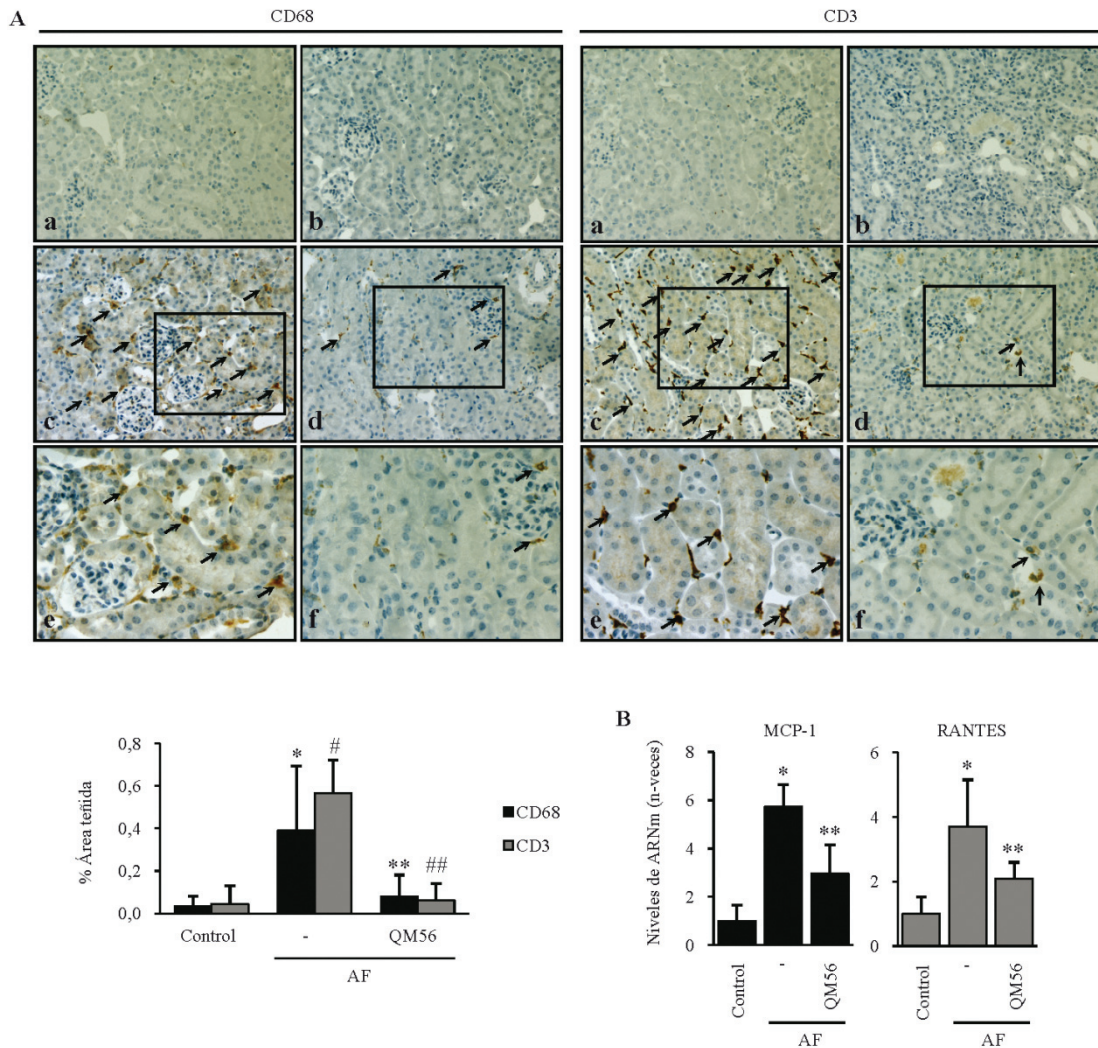


Los animales se dividieron en tres grupos de 8 ratones cada uno: a) ratones controles sanos, tratados con los vehículos del AF y del QM56 (grupo Control); b) ratones con FRA, tratados con AF y el vehículo del QM56 (grupo AF), y c) ratones tratados con QM56 y AF (grupo QM56+AF). El pretratamiento de los ratones con QM56 seis horas antes de la inyección intraperitoneal de ácido fólico, mejoró la función renal como muestran los niveles más bajos de urea y de creatinina en el grupo QM56+AF, respecto al grupo AF (Figura 29.1.A). Además, el grupo QM56+AF presentó una mejoría del daño tubular evaluado mediante los niveles de inducción de las proteínas Kim-1 y Ngal (Figura 29.1.D). Por otra parte, la evaluación de la apoptosis mediante inmunohistoquímica de caspasa 3 y tinción de TUNEL®, demostró que el QM56 disminuyó la actividad de caspasa 3 y la fragmentación del ADN en las células tubulares de los animales del grupo QM56+AF (Figura 29.1.B y C).

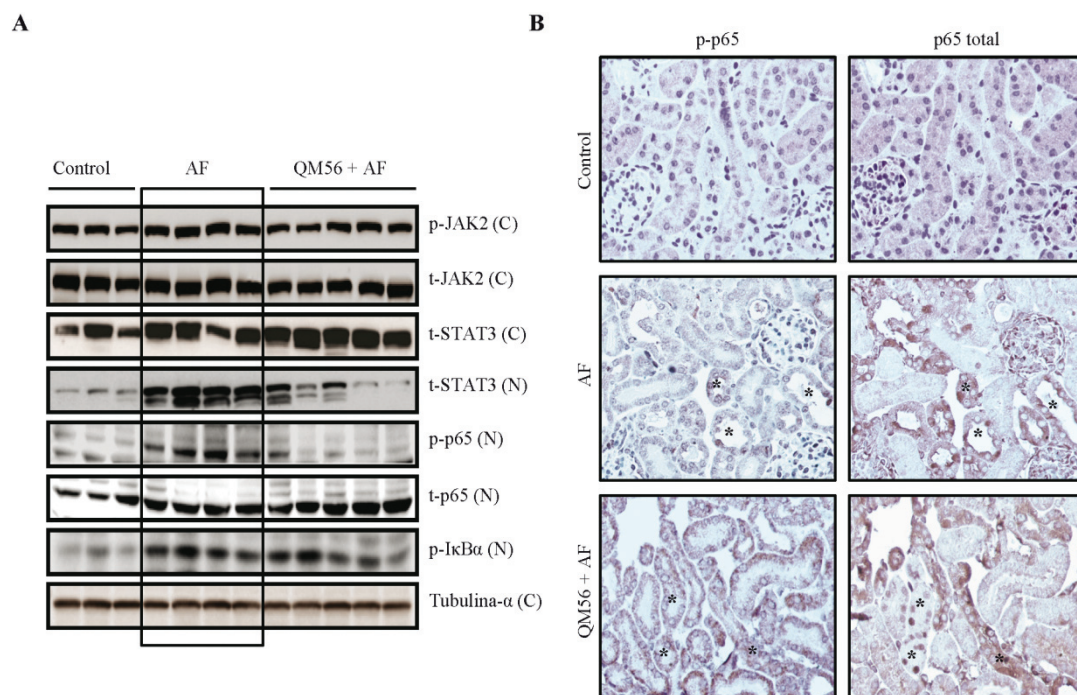
Sobre la respuesta inflamatoria, los ratones del grupo AF exhibieron una expresión renal aumentada de los niveles transcripcionales de MCP-1 y RANTES, respecto a los ratones del grupo Control, y esta respuesta fue significativamente inhibida en el grupo QM56+AF (Figura 29.2.B). Además, este último grupo de animales presentó una menor infiltración renal de macrófagos CD68 positivos y linfocitos CD3 positivos respecto al grupo AF (Figura 29.2.A).

Finalmente, se estudiaron en el modelo murino los eventos de señalización claves para el efecto proinflamatorio de TWEAK y su regulación por QM56 observados previamente en células tubulares. Mediante WB realizados en extractos citoplásmicos y nucleares del tejido renal, el tratamiento con AF produjo un aumento en la fosforilación de la JAK2 citoplasmática respecto del grupo control. Los niveles nucleares de STAT3 indicativos de la fosforilación previa de la proteína y de la isoforma fosforilada de p65 también se encontraron aumentados en el grupo AF. La activación de la ruta JAK2/STAT3 y la fosforilación de p65 disminuyeron significativamente en el grupo QM56 + AF respecto al grupo AF (Figura 29.3.A). Sin embargo, aunque QM56 disminuyó la síntesis de genes inflamatorios dependientes de NF- $\kappa$ B, no evitó la translocación nuclear de p65 dependiente de I $\kappa$ B $\alpha$  (Figura 29.3.B).

Estos resultados, apoyan los mecanismos descritos en las células tubulares en cultivo para el efecto antiinflamatorio de QM56 *in vivo*.



**Figura 29.2. El QM56 reduce la inflamación renal en el modelo murino de fracaso renal agudo por ácido fólico.** **A)** Evaluación del infiltrado inflamatorio tubulointersticial mediante detección inmunohistoquímica. El infiltrado de macrófagos se evaluó mediante tinción del marcador CD68 (panel mostrado a la izquierda) y el infiltrado de linfocitos mediante tinción del marcador CD3 (panel mostrado a la derecha). Se muestran imágenes representativas del grupo de ratones control sin tratar (a), de los tratados únicamente con AF (c, con detalle en e) y de los tratados tanto por AF como con QM56 (d, con detalle en f). El control de la técnica se muestra en b. Las áreas delimitadas en c y d se muestran ampliadas en e y f, respectivamente. Las flechas negras indican zonas con infiltrado. Las imágenes originales se tomaron con un aumento de 200x y las ampliaciones a 400x. La cuantificación se llevó a cabo mediante evaluación del área positiva para cada uno de los marcadores en grupos experimentales de 8 ratones. En el panel inferior se muestran las medias  $\pm$  SD de dicha cuantificación. \* $p < 0,02$  frente al valor del grupo Control, \*\* $p < 0,02$  respecto al grupo tratado con AF, # $p < 0,01$  contra el grupo Control y ### $p < 0,01$  respecto al grupo AF. **B)** Expresión génica de MCP-1 y RANTES obtenidos mediante q-RT-PCR en extractos provenientes de riñones de ratones tratados con AF y con QM56 y AF. \* $p < 0,05$  respecto al grupo Control y \*\* $p < 0,05$  frente al grupo AF.



**Figura 29.3. En el modelo de daño agudo por ácido fólico, el QM56 reduce la activación de los mediadores inflamatorios previamente identificados en los ensayos celulares. A)** Evaluación de los niveles de fosforilación de JAK2 mediante WB a partir de extractos renales nucleares (N) y citoplásmicos (C). La forma fosforilada de JAK2 está incrementada en el grupo con daño agudo por AF ( $1.4 \pm 0,1$  veces sobre grupo Control sin tratar,  $p < 0,02$ ) y esta fosforilación es reducida de forma significativa por el pretratamiento con QM56 ( $1,1 \pm 0,1$  veces respecto a grupo Control no tratado,  $p < 0,01$  frente al grupo AF). **B)** En el grupo de animales tratados con AF, los túbulos con una mayor expresión nuclear de p65 (asteriscos) exhiben también una mayor expresión nuclear de p-p65 (Ser536), mientras estos cambios están impedidos en el grupo tratado con QM56. Las imágenes pertenecen a la colocalización de p65 y p-p65 observado por inmunohistoquímica realizada en cortes histológicos consecutivos. Aumento 200x.





*Discusión*



## **Parte I: Estudio de los mecanismos de la transición epitelio-mesénquima inducida por los inhibidores de calcineurina ciclosporina A y tacrolimus en el epitelio tubular renal**

El principal aporte de las investigaciones correspondientes a este apartado es el esclarecimiento de un mecanismo regulatorio que contribuye a los efectos de los inhibidores de calcineurina sobre la regulación de proteínas adhesivas y la TEM y que involucra la inhibición de GSK3 y la estabilización de Snail de forma independiente de TGF- $\beta$ 1.

La integridad de la red de proteínas de las uniones adherentes y estrechas es vital para el mantenimiento de la polaridad, la permeabilidad selectiva de la membrana plasmática y también del número de células del epitelio tubular, factores que en su conjunto redundan en la preservación de la fisiología del riñón. Tras el desarrollo, las cadherinas desempeñan un rol primordial en el mantenimiento de la estructura tisular y en la motilidad celular (Tepass U, 2000). La cadherina-E es la principal cadherina presente en las células tubulares y constituye una diana inicial para diversos nefrotóxicos (Prozialeck WC & Edwards JR, 2007). La pérdida de cadherina-E es una característica distintiva de la TEM y también influye sobre la estabilidad de la capa epitelial (Ivanov AI, 2008; Peinado H, 2007; Prozialeck WC & Edwards JR, 2007). La regulación negativa de la cadherina-E y de otros componentes de las uniones estrechas por CsA puede contribuir a la pérdida de  $\beta$ -catenina, una proteína regulada por modificaciones postraduccionales que modula la expresión de proteínas de adhesión, cuando es translocada al núcleo (Capaldo CT & Macara IG, 2007; Ling H, 2003).

En este trabajo de tesis exploramos distintas rutas intracelulares que podrían intervenir en la pérdida de cadherina-E en células estimuladas con CNIs. El citoesqueleto de actina es una unidad funcional estructuralmente dinámica, lo que implica contantes procesos de polimerización y despolimerización con participación de las formas nativa (monómeros de actina G) y elongada (microfilamentos de actina F) en su formación. El citoesqueleto de actina estabiliza las uniones adherentes y estrechas y la perturbación de la dinámica formativa de los microfilamentos es causal de la pérdida de expresión de la cadherina-E (Angres B, 1996; Ivanov AI, 2008). Nuestros resultados demuestran que en las células tubulares estimuladas con CsA, la actina F pierde rápidamente su ubicación membranal, probablemente por despolimerización, a la vez que se relocaliza en el citoplasma y también sufre una despolimerización diferencial con respecto a su forma nativa. Sin embargo, la estabilización previa de la actina con jasplakinolide no previno la pérdida de cadherina-E en las células estimuladas con CsA. Este hecho contradice un papel primario del citoesqueleto de actina en las regulaciones de los niveles de cadherina-E



en células tratadas con CsA, aunque no se podría descartar una contribución de la desestructuración de la actina cortical a largo plazo.

La activación de las caspasas en la apoptosis puede procesar la cadherina-E y desanclarla de la membrana plasmática (Keller SH & Nigam SK, 2003, Steinhilber U, 2001). Además, agentes pro-apoptóticos inhiben la síntesis de proteínas de una forma dependiente de la actividad de caspasas (Jeffrey IW, 2002). Sobre la base de estos antecedentes, se podría especular que la menor expresión de proteínas adhesivas tanto a nivel transcripcional como por un posible procesamiento postraduccional, podría ser consecuencia de la acción apoptótica de la CsA. Sin embargo, en nuestro sistema experimental, la inhibición de caspasas previno la apoptosis pero no la pérdida de cadherina-E y ZO-1. Estos resultados son coincidentes con otros estudios en donde se observó que la inhibición de caspasas tampoco previno la caída de cadherina-E e incluso facilitó la represión de la expresión y la TEM inducidas por TGF- $\beta$ 1 (Docherty NG, 2006).

Los represores transcripcionales de cadherina-E son restrictivamente activados en estados fisiológicos específicos durante el desarrollo y su expresión extemporánea en células adultas causa enfermedad. Entre ellos, ZEB, E12/E47, Snail/Slug y Twist, han sido muy relacionados con la promoción de TEM y metástasis tumorales, y los dos últimos especialmente con la TEM de células tubulares y fibrosis renal (Boutet A, 2006; Gómez I, 2011; Peinado H, 2004, Peinado H, 2007). Aquí, demostramos que en células tubulares la CsA indujo de forma concertada un aumento de los niveles proteicos de Snail, Slug y Twist. Sin embargo, la CsA incrementó los niveles del ARN mensajero de Slug pero no los de Snail, puntualizando una regulación diferencial para los miembros de la familia de proteínas Snail. Además, en forma coincidente con numerosos estudios, el silenciamiento de Snail en células tubulares sometidas a tratamiento con CsA confirmó el papel de Snail en la mediación de TEM. Así, en células renales en reposo, el silenciamiento de Snail no afectó a los niveles basales de expresión de cadherina-E. Sin embargo, en las células estimuladas con CsA, el silenciamiento de Snail impidió la pérdida de cadherina-E. Estos resultados indicaron que la actividad de Snail es prescindible para la regulación de cadherina-E en células en reposo pero es un mediador su represión inducida en células tratadas con CsA.

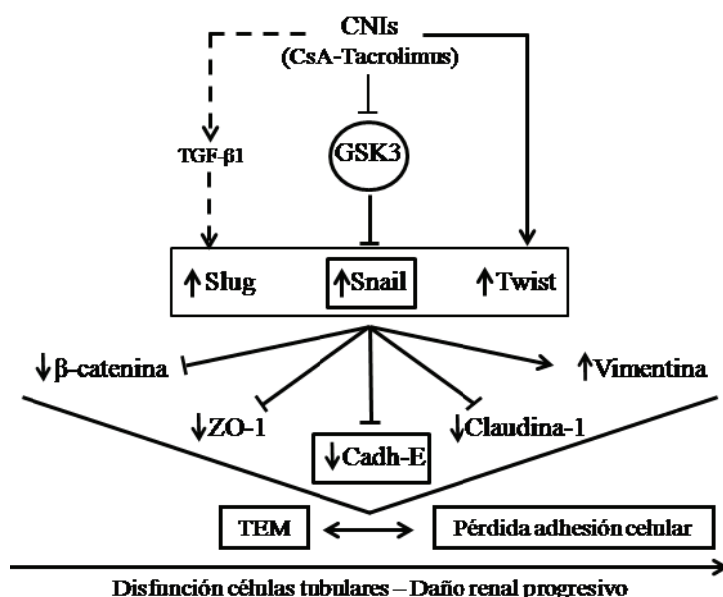
La enzima GSK3 es una serina/treonina quinasa objeto de numerosas investigaciones debido a que participa en la regulación de múltiples procesos celulares (Jope RS & Johnson GV, 2004). Además, GSK3 tiene un rol activo en la degradación de Snail mediante la inducción de modificaciones postraduccionales que implican su fosforilación sitio-específica y posterior degradación por el proteasoma (Zhou BP, 2004). Nuestros estudios demostraron que CsA



fosforila GSK3 en las serinas 21/9, un hecho indicativo de su inactivación (Bachelder RE, 2005). Además, la fosforilación inactivadora de GSK3 coincidió con el aumento de niveles proteicos de Snail, tanto en células tubulares murinas como humanas, lo que sugirió una relación entre inactivación de GSK3 e incremento de Snail. Los ensayos de silenciamiento evidenciaron de forma directa la participación de GSK3 sobre la expresión de Snail. Así, la anulación específica de GSK3 favoreció una leve acumulación de Snail en células tubuloepiteliales en reposo, dando cuenta de una actividad regulatoria basal de GSK3 sobre el control de los niveles de expresión de Snail. Sin embargo, la ausencia de GSK3 previno una posterior acumulación de Snail en respuesta a la CsA. Además, dos inhibidores conocidos de GSK3, LiCl y SB418256, mimetizaron los efectos de la CsA y del tacrolimus sobre la ruta GSK3/Snail/cadherina-E. Estos resultados sugirieron que el aumento de los niveles proteicos de Snail en ausencia de regulación transcripcional, debía producirse por una disminución de su degradación por la falta de actividad de GSK3. En este sentido, los ensayos con cicloheximida demostraron que en ausencia de nueva síntesis de Snail, la CsA aumenta la estabilidad de Snail. Tomados en conjunto, estos resultados confirman la contribución de GSK3 a la degradación de Snail en estado estacionario y revelan nuevos mediadores moleculares para las acciones nefrotóxicas de los CNIs en células tubulares.

El factor de crecimiento TGF- $\beta$ 1 es un promotor clave de la TEM que ha sido relacionado con la patogenia del daño tubular por los CNIs. Las células tubulares renales expuestas a concentraciones débilmente apoptóticas de CsA liberan TGF- $\beta$ 1 como mediador de la TEM y ocasionan la pérdida de proteínas de adhesión (Feldman G, 2007; McMorro T, 2005; Slattey C, 2005). Sin embargo, el bloqueo del TGF- $\beta$ 1 previno sólo parcialmente el daño tubular y la fibrosis inducida por la CsA (Ling H, 2003), lo que podría ser indicativo de la activación de otros mecanismos. Los resultados del presente trabajo apoyan la hipótesis de la activación de mecanismos adicionales al TGF- $\beta$ 1. Así, la activación del eje GSK3/Snail por los CNIs fue independiente de la actividad de TGF- $\beta$ 1. La identificación de esta vía de señalización alternativa podría ofrecer oportunidades terapéuticas futuras para el tratamiento o prevención de la nefrotoxicidad por los CNIs, evitando el bloqueo directo de la ruta del TGF- $\beta$ 1. La intervención sobre el TGF- $\beta$ 1 se ha relacionado con la desregulación de procesos proliferativos y con procesos neoplásicos (Christ M, 1994; Grainger DJ, 2004; Seoane J, 2006). En este sentido, GSK3 ha sido propuesto como una diana terapéutica y se están desarrollando fármacos inhibidores experimentales (Cohen P & Goedert M, 2004; Jope RS & Johnson GV, 2004; Meijer L, 2004). Los inhibidores de GSK3 previenen la muerte de células tubulares inducida por CsA (Sarró E, 2012). Snail constituye también una atractiva diana terapéutica porque su reactivación aberrante en el tejido adulto está inequívocamente unida a fibrosis renal (Boutet A, 2006). En este sentido, se han realizado esfuerzos para sintetizar inhibidores farmacológicos

específicos que prevengan la interacción de Snail con secuencias E-box del ADN (Harney AS, 2009).



**Figura 30. Ruta propuesta, independiente de TGF-β1, disparada por CNIs para inducir TEM y represión de la expresión de proteínas de adhesión en células tubulares renales.** Altas y tóxicas dosis de inhibidores de calcineurina, CsA y tacrolimus, regulan al alza la expresión de represores transcripcionales, de la familia Snail (Snail y Slug), y Twist. Tanto la inducción transcripcional directa de Slug y Twist como la estabilización de la proteína Snail a través de la inhibición de la enzima GSK3 contribuyen al incremento de los niveles de represores transcripcionales. Estos represores y, en particular, Snail, promueve pérdida de proteínas de adhesión epitelial (cadherina E, ZO-1, claudina-1, y β-Catenina) y la eventual adquisición de marcadores mesenquimales (vimentina) como parte del proceso de TEM. Ambos fenómenos resulta en la disfunción de las células tubulares que contribuye a la progresión de daño renal. Estas vías no son disparadas por TGF-β1. Sin embargo, un mecanismo alternativo que involucra la secreción de TGF-β1 inducida por CNIs ha sido propuesta que ocurre a dosis bajas y a tiempos largos en células menos sensibles a la apoptosis.

La contribución relativa de la ruta de señalización GSK3/Snail/cadherina-E descrita en esta tesis a la nefrotoxicidad por CNIs *in vivo* debe ser aun explorada en detalle. Sin embargo, una vez demostrado que la ruta puede ser activada en células en cultivo (**resumido en Figura 30**), nosotros hipotetizamos que también podría estarlo *in vivo* bajo ciertas circunstancias microambientales, como por ejemplo el contacto de las células tubulares con altas dosis relativas del fármaco por deficiencias en su metabolización. Al respecto, existe una gran variabilidad interindividual en la respuesta clínica a los CNIs de los pacientes trasplantados (Naesens M, 2009; Pallet N & Legendre C, 2010). Los niveles locales de CNIs en riñón son mucho mayores que los niveles sistémicos, y se ha propuesto que la acumulación intracelular, variable entre individuos o por condicionantes microambientales, podría determinar la gravedad de su toxicidad. Así, aunque esta toxicidad en células expuestas a una baja concentración local de CNIs pudiera involucrar al TGF-β1, mayores concentraciones de CNIs y/o un ambiente permisivo que promuevan la apoptosis podrían también involucrar las rutas nocivas independientes de TGF-β1 descritas en este trabajo

## Parte II: Estudio de los mecanismos de la transición epitelio-mesénquima inducida por la citoquina TWEAK en el epitelio tubular renal

En este trabajo demostramos que TWEAK induce la TEM en células del túbulo renal a través de rutas inflamatorias implicando la activación de NF- $\kappa$ B y MAPK/ERK1/2 y la subsecuente represión de la expresión de VDR. También mostramos que la deficiencia de TWEAK en ratones sometidos a obstrucción del uréter previene la TEM en túbulos renales.

Los cambios inducidos por TWEAK observados en nuestros experimentos en células en cultivo concuerdan con los principales criterios establecidos para definir la TEM tanto *in vivo* como *in vitro* (Zeisberg M & Neilson EG, 2009). De este modo, observamos que en células tubuloepiteliales, TWEAK disminuye la expresión de proteínas de las uniones adherentes y estrechas relacionadas con la aparición de la TEM, tales como la cadherina-E, la  $\beta$ -catenina y ZO-1 (Peinado H, 2004; Polette M, 2007). Además, TWEAK indujo la redistribución de la actina F e indujo una pérdida de la citoarquitectura epitelial que fue reemplazada por un patrón morfológico tipo fibroblastoide. También mostramos que los ratones con el riñón obstruido presentan células tubuloepiteliales positivas para el marcador de TEM  $\alpha$ SMA (Aresu L, 2007; Li Y, 2013; Lu ZY, 2013), mientras que en los ratones TWEAK KO con obstrucción ureteral no se encontraron células tubuloepiteliales teñidas para  $\alpha$ SMA. Las metaloproteasas pueden degradar matriz extracelular y moléculas que median las interacciones célula-célula y célula-matriz, contribuyendo al establecimiento de la TEM (Zeisberg M & Neilson EG, 2009; Zheng G, 2009). En células MCT, TWEAK aumentó la expresión génica de MMP-9.

Fn14 es el único receptor transductor de señales intracelulares conocido de TWEAK (Ruiz-Ortega M, 2014). En células renales cultivadas, Fn14 media acciones apoptóticas, inflamatorias y proliferativas de TWEAK (Ruiz-Ortega M, 2014). En este trabajo, hemos observado que Fn14 también transmite señales que resultan en la producción de TEM, hecho que remarca la importancia de la señalización por Fn14 en todos los tipos de respuestas promovidas por TWEAK.

El TGF- $\beta$ 1 es conocido como el mayor promotor de TEM durante la embriogénesis, progresión tumoral y fibrosis (Moustakas A & Heldin CH, 2007) pero hasta el momento no se conoce si puede mediar efectos del TWEAK. Los resultados de esta tesis señalan que TWEAK no reguló la expresión de TGF- $\beta$ 1 en células en cultivo ni en los riñones obstruido del modelo murino de UUO. Además, en células en cultivo, el bloqueo del TGF- $\beta$ 1 endógeno no previno la ocurrencia de la TEM, sugiriendo que TGF- $\beta$ 1 no participa en la inducción de TEM inducida por TWEAK.

La inflamación renal y la TEM son eventos mutuamente regulados. Estudios experimentales de nuestro laboratorio han demostrado que TWEAK promueve la inflamación renal a través de la activación de las rutas clásica y alternativa del NF- $\kappa$ B (Sanz AB, 2008; Sanz AB, 2010). En cáncer, el NF- $\kappa$ B contribuye a la TEM regulando la expresión de varios genes diana, incluyendo Snail y cadherina-E (Julien S, 2007). Nuestros resultados demuestran que el bloqueo de la ruta canónica de activación de NF- $\kappa$ B disminuyó la TEM inducida por TWEAK en células tubulares en cultivo. Además, las células tubulares de ratones con el riñón obstruido presentan coexpresión de p65 activado y de  $\alpha$ SMA en las mismas células, sugiriendo que  $\alpha$ SMA podría aparecer en respuesta a la activación de NF- $\kappa$ B. Por otra parte, la ruta no canónica de activación de NF- $\kappa$ B parece no ser relevante en la inducción de TEM dependiente de TWEAK.

Estudios realizados en nuestro laboratorio y en nuestro grupo de investigación mostraron que TWEAK activa ERK1/2, p38, PI3K/Akt y JAK2 en células tubulares (Sanz AB, 2009, Ucer AC, 2013). Otros investigadores establecieron que la activación de MAP quinasas regula la TEM causada por TGF- $\beta$ 1 y Ang II (Bakin AV, 2002; Ellenrieder V, 2001; Rodrigues-Díez R, 2008). En este trabajo, demostramos que el bloqueo farmacológico de ERK1/2 inhibió la TEM provocada por TWEAK.

La represión génica de HNF1 $\beta$  y cadherina-16 por TWEAK fue dependiente de ERK1/2 pero no de NF- $\kappa$ B, un hecho que concuerda con nuestros datos previos sobre la activación independiente por TWEAK de forma independiente de las vías de ERK1/2 y de NF- $\kappa$ B (Sanz AB, 2009). No obstante, NF- $\kappa$ B y ERK1/2 reprimieron la síntesis de VDR, sugiriendo que ambas vías convergen a nivel de la expresión de VDR.

El análisis de los riñones de los ratones WT sometidos a daño obstructivo por UUO demostró un descenso de la expresión renal de VDR, que no se observó en los riñones obstruidos de los ratones KO de TWEAK. En células tubulares, la sobreexpresión de VDR mediante transfección o tratamiento con paricalcitol previno la TEM y la eliminación del VDR mediante silenciamiento facilitó la TEM (Firrincieli D, 2013; Xiong M, 2012). En nuestros experimentos, el silenciamiento de VDR promovió la desestabilización de cadherina-E en condiciones basales. Este resultado advertiría de que la represión de la expresión de VDR podría contribuir a la TEM inducida por TWEAK. Al respecto, el activador de VDR paricalcitol previno la disminución de expresión de VDR y de cadherina-E, apoyando un papel para el receptor en la estabilización de cadherina-E en la superficie de la membrana en células tubulares en reposo.

En ensayos previos realizados en nuestro grupo de trabajo utilizamos arrays transcriptómicos para estudiar la expresión diferencial de genes inducida por TWEAK. Estos arrays mostraron

que TWEAK disminuye la expresión de NCoA-1, un coactivador al que VDR se une preferentemente (Carvallo L, 2007). En el presente trabajo, corroboramos mediante PCR que TWEAK disminuyó la expresión del gen de NCoA-1 en células en cultivo y que paricalcitol evitó este efecto. Estos resultados demostraron que los coactivadores del VDR podrían ser potenciales objetos de estudio en relación a la funcionalidad del TWEAK en la fisiopatología renal.

En estos momentos hay controversia sobre la aparición de TEM completa en el curso de la lesión renal y su contribución al conjunto de células con potencialidad para sintetizar matriz extracelular, en adición a los fibroblastos intersticiales (Zeisberg M & Duffield JS, 2010). Sin embargo, estudios de trazado de linaje, quimeras de médula ósea y ratones transgénicos con reporteros sugieren enfáticamente que las células tubulares pueden originar miofibroblastos en un modelo de UUO (Iwano M, 2002; LeBleu VS, 2013; Zeisberg M & Duffield JS, 2010). Independientemente de la magnitud de la TEM a la producción de MEC y fibrosis, se argumenta de forma creciente que la TEM puede ser un marcador que acompaña e incluso precede a la fibrosis renal (LeBleu VS, 2013; Zeisberg M & Duffield JS, 2010). Además, las células transformadas tienen la capacidad para sintetizar TGF- $\beta$ 1 y otras citoquinas con capacidad para regular positivamente su propia TEM o la de otros tipos celulares, por rutas autocrinas y paracrinas (Meran S & Steadman R, 2011). A este respecto, encontramos de forma ocasional pero claramente identificables células tubulares expresando  $\alpha$ SMA en riñones obstruidos de ratones WT a lo largo de las áreas con fibrosis intersticial. Sin embargo, en los riñones obstruidos de ratones deficientes en TWEAK, la ausencia de células tubulares positivas para  $\alpha$ SMA fue llamativa.

En conclusión, en esta tesis demostramos que la citoquina inflamatoria TWEAK promueve la pérdida de características epiteliales y la producción de TEM de forma independiente de TGF- $\beta$ 1 en células tubulares renales *in vitro*. Además, estas propiedades de TWEAK podrían contribuir a su acción fibrogénica *in vivo*, ya que hemos observado indicadores de TEM regulados por la expresión de TWEAK en un modelo murino de fibrosis renal de origen obstructivo. Finalmente, hemos identificado rutas promotoras de TEM que podrían ser moduladas terapéuticamente y que incluyen las vías de NF- $\kappa$ B y ERK1/2. Además, VDR surge como una diana terapéutica interesante ya que existen fármacos de uso clínico reguladores de su actividad.

### **Parte III: Estudio de los mecanismos de acción de la nanomedicina polimérica QM56 en la prevención del daño renal inducido por inhibidores de calcineurina y TWEAK**

El principal resultado obtenido en esta parte del trabajo de tesis es la descripción de un efecto antiinflamatorio del nanoconjugado QM56, que impide la activación del NF- $\kappa$ B mediante la inhibición de eventos postraduccionales claves.

El daño producido por el FRA se caracteriza por la muerte de células tubulares que es amplificado por una respuesta inflamatoria. De este modo, un agente que directamente inhiba la muerte celular y la inflamación podría tener un gran impacto en el tratamiento de esta patología. En el modelo de FRA por ácido fólico, el QM56 previno la apoptosis, la inflamación y conservó la función renal.

La inhibición de la apoptosis en modelos animales de FRA mejora los parámetros inflamatorios y el curso del daño renal (Kindt N, 2008; Wang Y, 2009), por lo que abordamos si los efectos antiinflamatorios del QM56 eran directos o por el contrario, dependían a su acción antiapoptótica. Primero estudiamos en células tubulares las propiedades antiapoptóticas del QM56 frente a toxinas exógenas (CsA) y endógenas (combinación de citoquinas inflamatorias que incluye TWEAK). De acuerdo a lo esperado, el QM56 previno en forma significativa la apoptosis provocada por CsA y por la combinación de las citoquinas inflamatorias TWEAK, TNF $\alpha$  e INF $\gamma$ . Estos resultados nos permitieron describir por primera vez la eficacia del efecto antiapoptótico del QM56 en células tubulares. El efecto antiapoptótico fue inicialmente atribuido a sus propiedades inhibitorias de la formación del apoptosoma (Acehan D, 2002, Malet G, 2006). Estos mismos inductores de apoptosis también producen efectos inflamatorios en las células tubulares, que también fueron inhibidos por QM56. La rápida acción inhibitoria del QM56 sobre la respuesta inflamatoria suscitada por la CsA o por la combinación de TWEAK/TNF $\alpha$ /INF $\gamma$ , que precedía a la activación de la apoptosis, sugirió que este efecto pudiera no ser atribuible a las propiedades antiapoptóticas del QM56. La objetivación del efecto antiinflamatorio del QM56 en respuesta a TWEAK tanto en células tubulares como en MEF deficientes en Apaf-1, permitió disociar definitivamente el efecto antiinflamatorio del antiapoptótico.

La actividad transcripcional del NF- $\kappa$ B se encuentra regulada a múltiples niveles, ya sea debido a modificaciones postraduccionales de sus precursores y coactivadores, de las subunidades monoméricas que lo conforman y de las secuencias de unión en el ADN (Hayden MS & Ghosh S, 2008). El QM56 previno la transcripción y síntesis de genes comandados por NF- $\kappa$ B pero no

la translocación nuclear del p65/RelA o la generación de complejos de unión entre NF- $\kappa$ B y ADN. Algunas de las acciones descritas para TWEAK en células tubulares son reguladas por la actividad de proteínas quinasas. Previamente se demostró que la inactivación de las quinasas ERK1/2, p38 y PI3K interfiere en la proliferación dependiente de NF- $\kappa$ B inducida por TWEAK en células tubulares (Sanz AB, 2009). En ensayos preliminares, establecimos que la inhibición de ERK1/2, p38 y PI3K no afectaba la actividad proinflamatoria de NF- $\kappa$ B. Sin embargo, la inhibición de la activación de la quinasa JAK2 mediante el inhibidor AG490 interfería negativamente en la actividad transcripcional del NF- $\kappa$ B evaluada en ensayos de gen reportero y mediante el estudio de la síntesis de MCP-1 y RANTES en respuesta a TWEAK. Sin embargo, la inhibición de JAK2 no evitaba la translocación nuclear del NF- $\kappa$ B ni su unión al ADN. Estos resultados desembocaron en los estudios que establecieron que QM56 mimetiza los efectos del inhibidor de JAK2 a todos los niveles, inhibiendo la fosforilación de JAK2/STAT3 y la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B sin interferir con la translocación nuclear y la unión al ADN de p65/NF- $\kappa$ B.

Diversas quinasas pueden modular la actividad del NF- $\kappa$ B mediante la fosforilación de proteínas reguladoras de la ruta NF- $\kappa$ B o del propio factor (Hayden MS & Ghosh S, 2008). De modo importante en esta tesis, hemos identificado una actividad de JAK2 promovida por TWEAK y necesaria para la fosforilación de p65/RelA en la serina 536 y en consecuencia para la transcripción de MCP-1 y RANTES dependiente de NF- $\kappa$ B. La fosforilación de la serina 536 es independiente de la actividad de I $\kappa$ B $\alpha$  y dirige la transcripción de un conjunto de genes inflamatorios sin afectar a la translocación nuclear o la unión al ADN de p65 ni a la activación general de NF- $\kappa$ B (Sasaki CY, 2005). AG490 y QM56 evitaron la fosforilación de p65 inducida por TWEAK. Esto puede explicar la observación de que QM56 previene el aumento de quimioquinas dependiente de NF- $\kappa$ B en respuesta a TWEAK, sin producir cambios en la translocación nuclear de NF- $\kappa$ B ni en su unión al ADN. Apoyando la hipótesis de que sólo ciertos genes dependientes de p65 serían regulados por el p65 fosforilado en la serina 536, ni QM56 o ni AG490 lograron evitar la inhibición dependiente de p65 de la expresión de RNA mensajero de Klotho inducida por TWEAK (observación no mostrada) (Moreno JA, 2011). Adicionalmente, probamos que QM56 también previno la activación de NF- $\kappa$ B y la respuesta inflamatoria a LPS mediante la inhibición de la ruta JAK2/STAT3 y de la fosforilación de p65. Estos datos, confirman que el efecto antiinflamatorio de QM56 es independiente del estímulo pero está restringido a la ruta de señalización JAK2/STAT3. Además de una posible aplicación al FRA, ya que se observó la activación de la señalización JAK2/STAT3 y NF- $\kappa$ B/p-p65 en el FRA inducido por AF pero no en ratones tratados con AF y QM56, estas observaciones podrían tener aplicación en la sepsis. En efecto, el LPS es uno de los mediadores fundamentales de la respuesta inflamatoria generalizada que caracteriza a la sepsis.



El QM56 fue originariamente descrito como inhibidor químico de Apaf-1 que se unía a su dominio CARD (Malet G, 2006; Vicent MJ & Pérez-Payá E, 2006). Sin embargo, nuestros estudios sugieren dianas adicionales para su acción antiinflamatoria. QM56 es un compuesto polimérico que integra la primera generación de inhibidores de Apaf-1 derivados directamente de una biblioteca química (Malet G, 2006). El dominio CARD es un motivo de unión a proteína que interactúa con caspasas a través de interacciones CARD/CARD. Los dominios CARD han sido encontrados en muchas proteínas adaptadoras no relacionadas con apoptosis que median respuestas inflamatorias y que pueden regular la señalización por NF- $\kappa$ B (Hong GS & Jung YK, 2002). Sin embargo, la modulación de rutas adicionales señalizadoras de inflamación intracelular por proteínas que contienen dominios CARD ha sido menos caracterizada. La proteína NLRP1 posee un dominio CARD y tiene un papel crucial en la activación de caspasas proinflamatorias a través de la formación del inflamosoma pero también modula la función de Apaf-1 por interacciones CARD/CARD (Chu ZL, 2001; Tschopp J, 2003), sugiriendo la presencia de un cruce entre rutas. En el presente no se conoce si una molécula que une al dominio CARD de Apaf-1 podría tener alguna afinidad residual a unirse a dominios CARD de otras familias de proteínas, incluyendo aquellas relevantes para los procesos inflamatorios. Se están desarrollando nuevas generaciones de inhibidores de Apaf-1 que dotan a estos con una mayor rigidez conformacional y que mejorarían la selectividad específica del dominio CARD. De la misma manera, otras moléculas se podrían optimizar para su efecto anti-inflamatorio.

En conclusión, el nanoconjugado QM56 tiene una nueva acción antiinflamatoria no dependiente de apoptosis que parece al menos en parte relacionada con la inhibición de JAK2 y que resulta en la inhibición de la regulación transcripcional de ciertas dianas proinflamatorias de NF- $\kappa$ B. La combinación de los efectos antiapoptótico y antiinflamatorio podría ser beneficiosa en el FRA.

El QM56 ofrece una interesante plataforma para futuros desarrollos de fármacos aplicables a la enfermedad renal, por lo que son necesarios estudios adicionales para caracterizar la base molecular y estructural de su acción antiinflamatoria y para el desarrollo de nuevos inhibidores terapéuticos.





*Conclusiones*



Esta tesis doctoral ha identificado mecanismos de lesión del epitelio tubular independientes de TGF- $\beta$ 1 que desencadenan fenómenos de diferenciación característicos de la transición epitelio-mesénquima y que podrían ser comunes a toxinas exógenas y mediadores endógenos del daño renal. Después de confirmar la contribución de TWEAK *in vivo* a la diferenciación mesenquimal del epitelio tubular, hemos identificado una nanomedicina con capacidad para bloquear aspectos claves de la señalización intracelular de TWEAK que tiene acciones nefroprotectoras *in vivo*. En conclusión:

1. Los inhibidores de la calcineurina inducen fenómenos de diferenciación característicos de la transición epitelio-mesénquima en células tubulares de forma independiente a la acción del TGF- $\beta$ 1, pero dependientes de la activación de GSK3 y de la estabilización del represor transcripcional Snail.

2. La citoquina TWEAK induce fenómenos de diferenciación característicos de la transición epitelio-mesénquima en células tubulares de forma independiente a la acción del TGF- $\beta$ 1, pero dependientes de Snail, NF- $\kappa$ B y ERK1/2. Estas acciones de TWEAK sobre el epitelio tubular podrían contribuir a la fibrosis renal por obstrucción ureteral.

3. La nanomedicina QM56 inhibe la activación de las rutas JAK2/STAT3 y de NF- $\kappa$ B en respuesta a estímulos proinflamatorios, como TWEAK, en células tubulares cultivadas e *in vivo*, protegiendo del fracaso renal agudo.





## *Bibliografia*



- Acehan D, Jiang X, Morgan DG, Heuser JE, Wang X and Akey CW** (2002). "Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation." *Mol Cell* 9(2): 423-432.
- Al-Hamidi A, Pekalski M, Robertson H, Ali S and Kirby JA** (2008). "Renal allograft rejection: the contribution of chemokines to the adhesion and retention of alphaE(CD103)beta7 integrin-expressing intratubular T cells." *Mol Immunol* 45(15): 4000-4007.
- Anders HJ, Sayyed SA and Vielhauer V** (2010). "Questions about chemokine and chemokine receptor antagonism in renal inflammation." *Nephron Exp Nephrol* 114(2): e33-38.
- Angres B, Barth A and Nelson WJ** (1996). "Mechanism for transition from initial to stable cell-cell adhesion: kinetic analysis of E-cadherin-mediated adhesion using a quantitative adhesion assay." *J Cell Biol* 134(2): 549-557.
- Aresu L, Rastaldi MP, Scanziani E, Baily J, Radaelli E, Pregel P and Valenza F** (2007). "Epithelial-mesenchymal transition (EMT) of renal tubular cells in canine glomerulonephritis." *Virchows Arch* 451(5): 937-942.
- Ashkenazi A and Dixit VM** (1999). "Apoptosis control by death and decoy receptors." *Curr Opin Cell Biol* 11(2): 255-260.
- Atkins JH and Gershell LJ** (2002). "Selective anticancer drugs." *Nature Rev. Cancer* 1: 645.
- Bachelder RE, Yoon SO, Franci C, de Herreros AG and Mercurio AM** (2005). "Glycogen synthase kinase-3 is an endogenous inhibitor of Snail transcription: implications for the epithelial-mesenchymal transition." *J Cell Biol* 168(1): 29-33.
- Bakin AV, Rinehart C, Tomlinson AK and Arteaga CL** (2002). "p38 mitogen-activated protein kinase is required for TGFbeta-mediated fibroblastic transdifferentiation and cell migration." *J Cell Sci* 115(Pt 15): 3193-3206.
- Bakker RC, van Kooten C, van de Lagemaat-Paape ME, Daha MR and Paul LC** (2002). "Renal tubular epithelial cell death and cyclosporin A." *Nephrol Dial Transplant* 17(7): 1181-1188.
- Barbera MJ, Puig I, Dominguez D, Julien-Grille S, Guaita-Esteruelas S, Peiro S, Baulida J, Franci C, Dedhar S, Larue L and Garcia de Herreros A** (2004). "Regulation of Snail transcription during epithelial to mesenchymal transition of tumor cells." *Oncogene* 23(44): 7345-7354.
- Barrallo-Gimeno A and Nieto MA** (2005). "The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer." *Development* 132(14): 3151-3161.
- Bellomo R, C. Ronco C, Kellum JA, Mehta RL, Palevsky P and Acute Dialysis Quality Initiative, workgroup** (2004). "Acute renal failure - definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group." *Crit Care* 8(4): R204-212.
- Bellomo R, Kellum JA and Ronco C** (2012). "Acute kidney injury." *Lancet* 380(9843): 756-766.
- Bennett WM** (1995). "The nephrotoxicity of immunosuppressive drugs." *Clin Nephrol* 43 Suppl 1: S3-7.

- Berzal S, Alique M, Ruiz-Ortega M, Egido J, Ortiz A and Ramos AM** (2012). "GSK3, snail, and adhesion molecule regulation by cyclosporine A in renal tubular cells." *Toxicol Sci* 127(2): 425-437.
- Blanco MJ, Moreno-Bueno G, Sarrio D, Locascio A, Cano A, Palacios J and Nieto AM** (2002). "Correlation of Snail expression with histological grade and lymph node status in breast carcinomas." *Oncogene* 21(20): 3241-3246.
- Bonventre JV and Yang L** (2011). "Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury." *J Clin Invest* 121(11): 4210-4221.
- Boubred F, Saint-Faust M, Buffat C, Ligi I, Grandvilllemin I and Simeoni U** (2013). "Developmental Origins of Chronic Renal Disease: An Integrative Hypothesis." *Int J Nephrol* 2013: 346067.
- Boutet A, De Frutos CA, Maxwell PH, Mayol MJ, Romero J and Nieto MA** (2006). "Snail activation disrupts tissue homeostasis and induces fibrosis in the adult kidney." *EMBO J* 25(23): 5603-5613.
- Boutet A, Esteban MA, Maxwell PH and Nieto MA** (2007). "Reactivation of Snail genes in renal fibrosis and carcinomas: a process of reversed embryogenesis?" *Cell Cycle* 6(6): 638-642.
- Bozic M, de Rooij J, Parisi E, Ortega MR, Fernandez E and Valdivielso JM** (2011). "Glutamatergic signaling maintains the epithelial phenotype of proximal tubular cells." *J Am Soc Nephrol* 22(6): 1099-1111.
- Brady HR** (1994). "Leukocyte adhesion molecules and kidney diseases." *Kidney Int* 45(5): 1285-1300.
- Brocchini S and Duncan R.** (1999). Polymer–drug conjugates: drug release from pendent linkers. *Encyclopaedia of controlled release*. M. E. Wiley, NY, USA 786–816
- Bubb MR, Senderowicz AM, Sausville EA, Duncan KL and Korn ED** (1994). "Jaspilakinolide, a cytotoxic natural product, induces actin polymerization and competitively inhibits the binding of phalloidin to F-actin." *J Biol Chem* 269(21): 14869-14871.
- Bucala R, Spiegel LA, Chesney J, Hogan M and Cerami A** (1994). "Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair." *Mol Med* 1(1): 71-81.
- Butcher EC and Picker LJ** (1996). "Lymphocyte homing and homeostasis." *Science* 272(5258): 60-66.
- Caballo C, Palomo M, Cases A, Galan AM, Molina P, Vera M, Bosch X, Escolar G and Diaz-Ricart M** (2012). "NFkappaB in the development of endothelial activation and damage in uremia: an in vitro approach." *PLoS One* 7(8): e43374.
- Campbell JJ, Foxman EF and Butcher EC** (1997). "Chemoattractant receptor cross talk as a regulatory mechanism in leukocyte adhesion and migration." *Eur J Immunol* 27(10): 2571-2578.
- Campbell S, Michaelson J, Burkly L and Putterman C** (2004). "The role of TWEAK/Fn14 in the pathogenesis of inflammation and systemic autoimmunity." *Front Biosci* 9: 2273-2284.
- Campbell S, Burkly LC, Gao HX, Berman JW, Su L, Browning B, Zheng T, Schiffer L, Michaelson JS and Putterman C** (2006). "Proinflammatory effects of TWEAK/Fn14 interactions in glomerular mesangial cells." *J Immunol* 176(3): 1889-1898.



- Cano A, Perez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG, Portillo F and Nieto MA** (2000). "The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression." *Nat Cell Biol* 2(2): 76-83.
- Cao CC, Ding XQ, Ou ZL, Liu CF, Li P, Wang L and Zhu CF** (2004). "In vivo transfection of NF-kappaB decoy oligodeoxynucleotides attenuate renal ischemia/reperfusion injury in rats." *Kidney Int* 65(3): 834-845.
- Capaldo CT and Macara IG** (2007). "Depletion of E-cadherin disrupts establishment but not maintenance of cell junctions in Madin-Darby canine kidney epithelial cells." *Mol Biol Cell* 18(1): 189-200.
- Carvajal G, Rodriguez-Vita J, Rodrigues-Diez R, Sanchez-Lopez E, Ruperez M, Cartier C, Esteban V, Ortiz A, Egido J, Mezzano SA and Ruiz-Ortega M** (2008). "Angiotensin II activates the Smad pathway during epithelial mesenchymal transdifferentiation." *Kidney Int* 74(5): 585-595.
- Carvallo L, Henriquez B, Olate J, van Wijnen AJ, Lian JB, Stein GS, Onate S, Stein JL and Montecino M** (2007). "The 1alpha,25-dihydroxy Vitamin D3 receptor preferentially recruits the coactivator SRC-1 during up-regulation of the osteocalcin gene." *J Steroid Biochem Mol Biol* 103(3-5): 420-424.
- Cecconi F, Alvarez-Bolado G, Meyer BI, Roth KA and Gruss P** (1998). "Apaf1 (CED-4 homolog) regulates programmed cell death in mammalian development." *Cell* 94(6): 727-737.
- Clemens MJ, Bushell M, Jeffrey IW, Pain VM and Morley SJ** (2000). "Translation initiation factor modifications and the regulation of protein synthesis in apoptotic cells." *Cell Death Differ* 7(7): 603-615.
- Clipstone NA and Crabtree GR** (1992). "Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation." *Nature* 357(6380): 695-697.
- Coca SG, Yusuf B, Shlipak MG, Garg AX and Parikh CR** (2009). "Long-term risk of mortality and other adverse outcomes after acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis." *Am J Kidney Dis* 53(6): 961-973.
- Coca SG, Cho KC and Hsu CY** (2011). "Acute kidney injury in the elderly: predisposition to chronic kidney disease and vice versa." *Nephron Clin Pract* 119 Suppl 1: c19-24.
- Coca SG, Singanamala S and Parikh CR** (2012). "Chronic kidney disease after acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis." *Kidney Int* 81(5): 442-448.
- Cohen P and Goedert M** (2004). "GSK3 inhibitors: development and therapeutic potential." *Nat Rev Drug Discov* 3(6): 479-487.
- Condon MB, Ashby D, Pepper RJ, Cook HT, Levy JB, Griffith M, Cairns TD and Lightstone L** (2013). "Prospective observational single-centre cohort study to evaluate the effectiveness of treating lupus nephritis with rituximab and mycophenolate mofetil but no oral steroids." *Ann Rheum Dis* 72(8): 1280-1286.
- Cordon-Cardo C and Prives C** (1999). "At the crossroads of inflammation and tumorigenesis." *J Exp Med* 190(10): 1367-1370.

- Coresh J, Selvin E, Stevens LA, Manzi J, Kusek JW, Eggers P, Van Lente F and Levey AS** (2007). "Prevalence of chronic kidney disease in the United States." *JAMA* 298(17): 2038-2047.
- Corredor M, Bujons J, Orzaez M, Sancho M, Perez-Paya E, Alfonso I and Messeguer A** (2013). "Optimizing the control of apoptosis by amide/triazole isosteric substitution in a constrained peptoid." *Eur J Med Chem* 63: 892-896.
- Crockett-Torabi E** (1998). "Selectins and mechanisms of signal transduction." *J Leukoc Biol* 63(1): 1-14.
- Chandel NS, Trzyna WC, McClintock DS and Schumacker PT** (2000). "Role of oxidants in NF-kappa B activation and TNF-alpha gene transcription induced by hypoxia and endotoxin." *J Immunol* 165(2): 1013-1021.
- Chawla LS and Kimmel PL** (2012). "Acute kidney injury and chronic kidney disease: an integrated clinical syndrome." *Kidney Int* 82(5): 516-524.
- Chen S, Bacon KB, Li L, Garcia GE, Xia Y, Lo D, Thompson DA, Siani MA, Yamamoto T, Harrison JK and Feng L** (1998). "In vivo inhibition of CC and CX3C chemokine-induced leukocyte infiltration and attenuation of glomerulonephritis in Wistar-Kyoto (WKY) rats by vMIP-II." *J Exp Med* 188(1): 193-198.
- Chen YH, Liang YX, Chen LQ, Liang JJ, Zhang J, Qiu J, Li WL, Hu JB, Xie KJ, Zhong WD, Chen LZ and Zheng KL** (2007). "[Prevention of diltiazem in tacrolimus-induced nephrotoxicity: experiment with rats]." *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 87(32): 2235-2237.
- Chow FY, Nikolic-Paterson DJ, Ozols E, Atkins RC, Rollin BJ and Tesch GH** (2006). "Monocyte chemoattractant protein-1 promotes the development of diabetic renal injury in streptozotocin-treated mice." *Kidney Int* 69(1): 73-80.
- Christ M, McCartney-Francis NL, Kulkarni AB, Ward JM, Mizel DE, Mackall CL, Gress RE, Hines KL, Tian H, Karlsson S and et al.** (1994). "Immune dysregulation in TGF-beta 1-deficient mice." *J Immunol* 153(5): 1936-1946.
- Chu ZL, Pio F, Xie Z, Welsh K, Krajewska M, Krajewski S, Godzik A and Reed JC** (2001). "A novel enhancer of the Apaf1 apoptosome involved in cytochrome c-dependent caspase activation and apoptosis." *J Biol Chem* 276(12): 9239-9245.
- Chua HL, Bhat-Nakshatri P, Clare SE, Morimiya A, Badve S and Nakshatri H** (2007). "NF-kappaB represses E-cadherin expression and enhances epithelial to mesenchymal transition of mammary epithelial cells: potential involvement of ZEB-1 and ZEB-2." *Oncogene* 26(5): 711-724.
- De Jager DJ, Grootendorst DC, Jager KJ, van Dijk PC, Tomas LM, Ansell D, Collart F, Finne P, Heaf JG, De Meester J, Wetzels JF, Rosendaal FR and Dekker FW** (2009). "Cardiovascular and noncardiovascular mortality among patients starting dialysis." *JAMA* 302(16): 1782-1789.
- Deniz H, Ogutmen B, Cakalagaoglu F, Tuglular S, Ozener C and Akoglu E** (2006). "Inhibition of the renin angiotensin system decreases fibrogenic cytokine expression in tacrolimus nephrotoxicity in rats." *Transplant Proc* 38(2): 483-486.

- Djamali A, Reese S, Hafez O, Vidyasagar A, Jacobson L, Swain W, Kolehmainen C, Huang L, Wilson NA and Torrealba JR** (2012). "Nox2 is a mediator of chronic CsA nephrotoxicity." *Am J Transplant* 12(8): 1997-2007.
- Docherty NG, O'Sullivan OE, Healy DA, Murphy M, O'Neill AJ, Fitzpatrick JM and Watson RW** (2006). "TGF-beta1-induced EMT can occur independently of its proapoptotic effects and is aided by EGF receptor activation." *Am J Physiol Renal Physiol* 290(5): F1202-1212.
- Doi K, Okamoto K, Negishi K, Suzuki Y, Nakao A, Fujita T, Toda A, Yokomizo T, Kita Y, Kihara Y, Ishii S, Shimizu T and Noiri E** (2006). "Attenuation of folic acid-induced renal inflammatory injury in platelet-activating factor receptor-deficient mice." *Am J Pathol* 168(5): 1413-1424.
- Donaruma LG and Razzano J** (1966). "Synthetic biologically active polymers. 3. A sulfapyridine-formaldehyde copolymer." *J Med Chem* 9(2): 258-259.
- Dong R, Wang Q, He XL, Chu YK, Lu JG and Ma QJ** (2007). "Role of nuclear factor kappa B and reactive oxygen species in the tumor necrosis factor-alpha-induced epithelial-mesenchymal transition of MCF-7 cells." *Braz J Med Biol Res* 40(8): 1071-1078.
- Du S, Hiramatsu N, Hayakawa K, Kasai A, Okamura M, Huang T, Yao J, Takeda M, Araki L, Sawada N, Paton AW, Paton JC and Kitamura M** (2009). "Suppression of NF-kappaB by cyclosporin a and tacrolimus (FK506) via induction of the C/EBP family: implication for unfolded protein response." *J Immunol* 182(11): 7201-7211.
- Duncan R, Kopecek J, Rejmanova P and Lloyd JB** (1983). "Targeting of N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymers to liver by incorporation of galactose residues." *Biochim Biophys Acta* 755(3): 518-521.
- Duncan R** (1992). "Drug-polymer conjugates: potential for improved chemotherapy." *Anticancer Drugs* 3(3): 175-210.
- Duncan R** (2003). "The dawning era of polymer therapeutics." *Nat Rev Drug Discov* 2(5): 347-360.
- Ellenrieder V, Hendler SF, Boeck W, Seufferlein T, Menke A, Ruhland C, Adler G and Gress TM** (2001). "Transforming growth factor beta1 treatment leads to an epithelial-mesenchymal transdifferentiation of pancreatic cancer cells requiring extracellular signal-regulated kinase 2 activation." *Cancer Res* 61(10): 4222-4228.
- Emery P. and Salmon M** (1991). "The immune response. 2. Systemic mediators of inflammation." *Br J Hosp Med* 45(3): 164-168.
- Esteban V, Lorenzo O, Ruperez M, Suzuki Y, Mezzano S, Blanco J, Kretzler M, Sugaya T, Egido J and Ruiz-Ortega M** (2004). "Angiotensin II, via AT1 and AT2 receptors and NF-kappaB pathway, regulates the inflammatory response in unilateral ureteral obstruction." *J Am Soc Nephrol* 15(6): 1514-1529.
- Fang TC, Alison MR, Cook HT, Jeffery R, Wright NA and Poulson R** (2005). "Proliferation of bone marrow-derived cells contributes to regeneration after folic acid-induced acute tubular injury." *J Am Soc Nephrol* 16(6): 1723-1732.

**Feldman G, Kiely B, Martin N, Ryan G, McMorrow T and Ryan MP** (2007). "Role for TGF-beta in cyclosporine-induced modulation of renal epithelial barrier function." *J Am Soc Nephrol* 18(6): 1662-1671.

**Feng XH and Derynck R** (2005). "Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads." *Annu Rev Cell Dev Biol* 21: 659-693.

**Firincieli D, Zuniga S, Rey C, Wendum D, Lasnier E, Rainteau D, Braescu T, Falguieres T, Boissan M, Cadoret A, Housset C and Chignard N** (2013). "Vitamin D nuclear receptor deficiency promotes cholestatic liver injury by disruption of biliary epithelial cell junctions in mice." *Hepatology* 58(4): 1401-1412.

**Fitzgerald DC, Meade KG, McEvoy AN, Lillis L, Murphy EP, MacHugh DE and Baird AW** (2007). "Tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) increases nuclear factor kappaB (NFkappaB) activity in and interleukin-8 (IL-8) release from bovine mammary epithelial cells." *Vet Immunol Immunopathol* 116(1-2): 59-68.

**Fougeray S, Bouvier N, Beaune P, Legendre C, Anglicheau D, Thervet E and Pallet N** (2011). "Metabolic stress promotes renal tubular inflammation by triggering the unfolded protein response." *Cell Death Dis* 2: e143.

**Francescato HD, Costa RS, Scavone C and Coimbra TM** (2007). "Parthenolide reduces cisplatin-induced renal damage." *Toxicology* 230(1): 64-75.

**Fujinaka H, Yamamoto T, Takeya M, Feng L, Kawasaki K, Yaoita E, Kondo D, Wilson CB, Uchiyama M and Kihara I** (1997). "Suppression of anti-glomerular basement membrane nephritis by administration of anti-monocyte chemoattractant protein-1 antibody in WKY rats." *J Am Soc Nephrol* 8(7): 1174-1178.

**Furuichi K, Wada T, Iwata Y, Kitagawa K, Kobayashi K, Hashimoto H, Ishiwata Y, Asano M, Wang H, Matsushima K, Takeya M, Kuziel WA, Mukaida N and Yokoyama H** (2003). "CCR2 signaling contributes to ischemia-reperfusion injury in kidney." *J Am Soc Nephrol* 14(10): 2503-2515.

**Furuichi K, Gao JL, Horuk R, Wada T, Kaneko S and Murphy PM** (2008). "Chemokine receptor CCR1 regulates inflammatory cell infiltration after renal ischemia-reperfusion injury." *J Immunol* 181(12): 8670-8676.

**Ghoreschi K, Laurence A and O'Shea JJ** (2009). "Janus kinases in immune cell signaling." *Immunol Rev* 228(1): 273-287.

**Gillum DM, Truong L and Tasby J** (1990). "Characterization of the interstitial cellular infiltrate in experimental chronic cyclosporine nephropathy." *Transplantation* 49(4): 793-797.

**Gomez I, Pena C, Herrera M, Munoz C, Larriba MJ, Garcia V, Dominguez G, Silva J, Rodriguez R, Garcia de Herreros A, Bonilla F and Garcia JM** (2011). "TWIST1 is expressed in colorectal carcinomas and predicts patient survival." *PLoS One* 6(3): e18023.

**Gonzalez-Guerrero C, Ocana-Salceda C, Berzal S, Carrasco S, Fernandez-Fernandez B, Cannata-Ortiz P, Egido J, Ortiz A and Ramos AM** (2013). "Calcineurin inhibitors recruit protein kinases JAK2 and JNK, TLR signaling and the UPR to activate NF-kappaB-mediated inflammatory responses in kidney tubular cells." *Toxicol Appl Pharmacol* 272(3): 825-841.

- Gotzmann J, Mikula M, Eger A, Schulte-Hermann R, Foisner R, Beug H and Mikulits W** (2004). "Molecular aspects of epithelial cell plasticity: implications for local tumor invasion and metastasis." *Mutat Res* 566(1): 9-20.
- Grainger DJ** (2004). "Transforming growth factor beta and atherosclerosis: so far, so good for the protective cytokine hypothesis." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24(3): 399-404.
- Grandaliano G, Gesualdo L, Ranieri E, Monno R, Montinaro V, Marra F and Schena FP** (1996). "Monocyte chemotactic peptide-1 expression in acute and chronic human nephritides: a pathogenetic role in interstitial monocytes recruitment." *J Am Soc Nephrol* 7(6): 906-913.
- Grande MT and Lopez-Novoa JM** (2008). "Therapeutical relevance of MAP-kinase inhibitors in renal diseases: current knowledge and future clinical perspectives." *Curr Med Chem* 15(20): 2054-2070.
- Grgic I, Campanholle G, Bijol V, Wang C, Sabbisetti VS, Ichimura T, Humphreys BD and Bonventre JV** (2012). "Targeted proximal tubule injury triggers interstitial fibrosis and glomerulosclerosis." *Kidney Int* 82(2): 172-183.
- Haase VH** (2009). "Oxygen regulates epithelial-to-mesenchymal transition: insights into molecular mechanisms and relevance to disease." *Kidney Int* 76(5): 492-499.
- Han S, Yoon K, Lee K, Kim K, Jang H, Lee NK, Hwang K and Young Lee S** (2003). "TNF-related weak inducer of apoptosis receptor, a TNF receptor superfamily member, activates NF-kappa B through TNF receptor-associated factors." *Biochem Biophys Res Commun* 305(4): 789-796.
- Harney AS, Lee J, Manus LM, Wang P, Ballweg DM, LaBonne C and Meade TJ** (2009). "Targeted inhibition of Snail family zinc finger transcription factors by oligonucleotide-Co(III) Schiff base conjugate." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(33): 13667-13672.
- Harris JM and Chess RB** (2003). "Effect of pegylation on pharmaceuticals." *Nat Rev Drug Discov* 2(3): 214-221.
- Haverty TP, Kelly CJ, Hines WH, Amenta PS, Watanabe M, Harper RA, Kefalides NA and Neilson EG** (1988). "Characterization of a renal tubular epithelial cell line which secretes the autologous target antigen of autoimmune experimental interstitial nephritis." *J Cell Biol* 107(4): 1359-1368.
- Hay ED** (1968). "Organization and fine structure of epithelium and mesenchyme in the developing chick embryo." *Epithelial-Mesenchymal Interactions*, Fleischmajer R and Billingham RE (eds), Baltimore, MD, USA: Williams & Wilkins Co: 31-55.
- Hay ED** (1990). "Role of cell-matrix contacts in cell migration and epithelial-mesenchymal transformation." *Cell Differ Dev* 32(3): 367-375.
- Hay ED** (1991). "Collagen and other matrix glycoproteins in embryogenesis." *Cell Biology of Extracellular Matrix*, Hay ED (ed.), New York: Plenum Press: 419-462.
- Hayden MS and Ghosh S** (2008). "Shared principles in NF-kappaB signaling." *Cell* 132(3): 344-362.
- Hazzan M, Hertig A, Buob D, Copin MC, Noel C, Rondeau E and Dubois-Xu YC** (2011). "Epithelial-to-mesenchymal transition predicts cyclosporine nephrotoxicity in renal transplant recipients." *J Am Soc Nephrol* 22(7): 1375-1381.

- Hehner SP, Hofmann TG, Droge W and Schmitz ML** (1999). "The antiinflammatory sesquiterpene lactone parthenolide inhibits NF-kappa B by targeting the I kappa B kinase complex." *J Immunol* 163(10): 5617-5623.
- Hertig A, Flier SN and Kalluri R** (2010). "Contribution of epithelial plasticity to renal transplantation-associated fibrosis." *Transplant Proc* 42(9 Suppl): S7-12.
- Hilton R** (2011). "Defining acute renal failure." *CMAJ* 183(10): 1167-1169.
- Holdsworth SR and Tipping PG** (2007). "Leukocytes in glomerular injury." *Semin Immunopathol* 29(4): 355-374.
- Hong GS and Jung YK** (2002). "Caspase recruitment domain (CARD) as a bi-functional switch of caspase regulation and NF-kappaB signals." *J Biochem Mol Biol* 35(1): 19-23.
- Hortelano S, Castilla M, Torres AM, Tejedor A and Bosca L** (2000). "Potentiation by nitric oxide of cyclosporin A and FK506-induced apoptosis in renal proximal tubule cells." *J Am Soc Nephrol* 11(12): 2315-2323.
- Hoste EA, Clermont G, Kersten A, Venkataraman R, Angus DC, De Bacquer D and Kellum JA** (2006). "RIFLE criteria for acute kidney injury are associated with hospital mortality in critically ill patients: a cohort analysis." *Crit Care* 10(3): R73.
- Hsu CY, McCulloch CE, Fan D, Ordonez JD, Chertow GM and Go AS** (2007). "Community-based incidence of acute renal failure." *Kidney Int* 72(2): 208-212.
- Huang B, Pi L, Chen C, Yuan F, Zhou Q, Teng J and Jiang T** (2012). "WT1 and Pax2 re-expression is required for epithelial-mesenchymal transition in 5/6 nephrectomized rats and cultured kidney tubular epithelial cells." *Cells Tissues Organs* 195(4): 296-312.
- Huang PS and Oliff A** (2001). "Drug-targeting strategies in cancer therapy." *Curr Opin Genet Dev* 11(1): 104-110.
- Huber TB, Edelstein CL, Hartleben B, Inoki K, Dong Z, Koya D, Kume S, Lieberthal W, Pallet N, Quiroga A, Ravichandran K, Susztak K, Yoshida S and Dong Z** (2012). "Emerging role of autophagy in kidney function, diseases and aging." *Autophagy* 8(7): 1009-1031.
- Humet M, Carbonell T, Masip I, Sanchez-Baeza F, Mora P, Canton E, Gobernado M, Abad C, Perez-Paya E and Messegue A** (2003). "A positional scanning combinatorial library of peptoids as a source of biological active molecules: identification of antimicrobials." *J Comb Chem* 5(5): 597-605.
- Ishikawa A, Fujita K and Suzuki K** (1997). "The influence of temocapril, an angiotensin converting enzyme inhibitor, on the cyclosporine-induced nephrotoxicity." *J Urol* 157(2): 739-742.
- Ivanov AI** (2008). "Actin motors that drive formation and disassembly of epithelial apical junctions." *Front Biosci* 13: 6662-6681.
- Iwano M, Plieth D, Danoff TM, Xue C, Okada H and Neilson EG** (2002). "Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis." *J Clin Invest* 110(3): 341-350.



- Izquierdo MC, Sanz AB, Mezzano S, Blanco J, Carrasco S, Sanchez-Nino MD, Benito-Martin A, Ruiz-Ortega M, Egido J and Ortiz A** (2012). "TWEAK (tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis) activates CXCL16 expression during renal tubulointerstitial inflammation." *Kidney Int* 81(11): 1098-1107.
- Jarmin DI, Kulmburg PA, Huber NE, Baumann G, Prieschl-Strassmayr EE and Baumruker T** (1994). "A transcription factor with AP3-like binding specificity mediates gene regulation after an allergic triggering with IgE and Ag in mouse mast cells." *J Immunol* 153(12): 5720-5729.
- Jeffrey IW, Bushell M, Tilleray VJ, Morley S and Clemens MJ** (2002). "Inhibition of protein synthesis in apoptosis: differential requirements by the tumor necrosis factor alpha family and a DNA-damaging agent for caspases and the double-stranded RNA-dependent protein kinase." *Cancer Res* 62(8): 2272-2280.
- Jinde K, Nikolic-Paterson DJ, Huang XR, Sakai H, Kurokawa K, Atkins RC and Lan HY** (2001). "Tubular phenotypic change in progressive tubulointerstitial fibrosis in human glomerulonephritis." *Am J Kidney Dis* 38(4): 761-769.
- Joep RS and Johnson GV** (2004). "The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3." *Trends Biochem Sci* 29(2): 95-102.
- Julien S, Puig I, Caretti E, Bonaventure J, Nelles L, van Roy F, Dargemont C, de Herreros AG, Bellacosa A and Larue L** (2007). "Activation of NF-kappaB by Akt upregulates Snail expression and induces epithelium mesenchyme transition." *Oncogene* 26(53): 7445-7456.
- Justo P, Lorz C, Sanz A, Egido J and Ortiz A** (2003). "Intracellular mechanisms of cyclosporin A-induced tubular cell apoptosis." *J Am Soc Nephrol* 14(12): 3072-3080.
- Justo P, Sanz AB, Sanchez-Nino MD, Winkles JA, Lorz C, Egido J and Ortiz A** (2006). "Cytokine cooperation in renal tubular cell injury: the role of TWEAK." *Kidney Int* 70(10): 1750-1758.
- Kakuta Y, Okumi M, Miyagawa S, Tsutahara K, Abe T, Yazawa K, Matsunami K, Otsuka H, Takahara S and Nonomura N** (2012). "Blocking of CCR5 and CXCR3 suppresses the infiltration of macrophages in acute renal allograft rejection." *Transplantation* 93(1): 24-31.
- Kalluri R and Neilson EG** (2003). "Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis." *J Clin Invest* 112(12): 1776-1784.
- Kanamori H, Matsubara T, Mima A, Sumi E, Nagai K, Takahashi T, Abe H, Iehara N, Fukatsu A, Okamoto H, Kita T, Doi T and Arai H** (2007). "Inhibition of MCP-1/CCR2 pathway ameliorates the development of diabetic nephropathy." *Biochem Biophys Res Commun* 360(4): 772-777.
- Katari SR, Magnone M, Shapiro R, Jordan M, Scantlebury V, Vivas C, Gritsch HA, McCauley J, Starzl T, Demetris AJ and Randhawa PS** (1997). "Tacrolimus nephrotoxicity after renal transplantation." *Transplant Proc* 29(1-2): 311.
- Keller SH and Nigam SK** (2003). "Biochemical processing of E-cadherin under cellular stress." *Biochem Biophys Res Commun* 307(2): 215-223.
- Khanna AK and Pieper GM** (2007). "NADPH oxidase subunits (NOX-1, p22phox, Rac-1) and tacrolimus-induced nephrotoxicity in a rat renal transplant model." *Nephrol Dial Transplant* 22(2): 376-385.

**Kim HJ, Litzenburger BC, Cui X, Delgado DA, Grabiner BC, Lin X, Lewis MT, Gottardis MM, Wong TW, Attar RM, Carboni JM and Lee AV (2007).** "Constitutively active type I insulin-like growth factor receptor causes transformation and xenograft growth of immortalized mammary epithelial cells and is accompanied by an epithelial-to-mesenchymal transition mediated by NF-kappaB and snail." *Mol Cell Biol* 27(8): 3165-3175.

**Kim KH, Lee ES, Cha SH, Park JH, Park JS, Chang YC and Park KK (2009).** "Transcriptional regulation of NF-kappaB by ring type decoy oligodeoxynucleotide in an animal model of nephropathy." *Exp Mol Pathol* 86(2): 114-120.

**Kindt N, Menzebach A, Van de Wouwer M, Betz I, De Vriese A and Conway EM (2008).** "Protective role of the inhibitor of apoptosis protein, survivin, in toxin-induced acute renal failure." *FASEB J* 22(2): 510-521.

**Krautwald S and Linkermann A (2013).** "The Fire Within - Pyroptosis in the Kidney." *Am J Physiol Renal Physiol*.

**Kroemer G, El-Deiry WS, Golstein P, Peter ME, Vaux D, Vandenabeele P, Zhivotovsky B, Blagosklonny MV, Malorni W, Knight RA, Piacentini M, Nagata S, Melino G and Nomenclature Committee on Cell Death (2005).** "Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death." *Cell Death Differ* 12 Suppl 2: 1463-1467.

**Kronke M, Leonard WJ, Depper JM, Arya SK, Wong-Staal F, Gallo RC, Waldmann TA and Greene WC (1984).** "Cyclosporin A inhibits T-cell growth factor gene expression at the level of mRNA transcription." *Proc Natl Acad Sci U S A* 81(16): 5214-5218.

**Lamoureux F, Mestre E, Essig M, Sauvage FL, Marquet P and Gastinel LN (2011).** "Quantitative proteomic analysis of cyclosporine-induced toxicity in a human kidney cell line and comparison with tacrolimus." *J Proteomics* 75(2): 677-694.

**Lange-Sperandio B, Trautmann A, Eickelberg O, Jayachandran A, Oberle S, Schmidtz F, Rodenbeck B, Homme M, Horuk R and Schaefer F (2007).** "Leukocytes induce epithelial to mesenchymal transition after unilateral ureteral obstruction in neonatal mice." *Am J Pathol* 171(3): 861-871.

**LeBleu VS, Taduri G, O'Connell J, Teng Y, Cooke VG, Woda C, Sugimoto H and Kalluri R (2013).** "Origin and function of myofibroblasts in kidney fibrosis." *Nat Med* 19(8): 1047-1053.

**Lee CH, Kim S, Kang CM, Kim WY, Kim J and Kim GH (2011).** "Altered expression of tight junction proteins in cyclosporine nephrotoxicity." *Am J Nephrol* 33(1): 7-16.

**Lee HS (2012).** "Mechanisms and consequences of TGF-ss overexpression by podocytes in progressive podocyte disease." *Cell Tissue Res* 347(1): 129-140.

**Levey AS, Beto JA, Coronado BE, Eknoyan G, Foley RN, Kasiske BL, Klag MJ, Mailloux LU, Manske CL, Meyer KB, Parfrey PS, Pfeffer MA, Wenger NK, Wilson PW and Wright JT, Jr. (1998).** "Controlling the epidemic of cardiovascular disease in chronic renal disease: what do we know? What do we need to learn? Where do we go from here? National Kidney Foundation Task Force on Cardiovascular Disease." *Am J Kidney Dis* 32(5): 853-906.

**Li HF, Cheng CF, Liao WJ, Lin H and Yang RB (2010).** "ATF3-mediated epigenetic regulation protects against acute kidney injury." *J Am Soc Nephrol* 21(6): 1003-1013.



- Li JH, Wang W, Huang XR, Oldfield M, Schmidt AM, Cooper ME and Lan HY** (2004). "Advanced glycation end products induce tubular epithelial-myofibroblast transition through the RAGE-ERK1/2 MAP kinase signaling pathway." *Am J Pathol* 164(4): 1389-1397.
- Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES and Wang X** (1997). "Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade." *Cell* 91(4): 479-489.
- Li Y, Kang YS, Dai C, Kiss LP, Wen X and Liu Y** (2008). "Epithelial-to-mesenchymal transition is a potential pathway leading to podocyte dysfunction and proteinuria." *Am J Pathol* 172(2): 299-308.
- Li Y, Sun Y, Liu F, Sun L, Li J, Duan S, Liu H, Peng Y, Xiao L, Liu Y, Xi Y, You Y, Li H, Wang M, Wang S and Hou T** (2013). "Norcantharidin inhibits renal interstitial fibrosis by blocking the tubular epithelial-mesenchymal transition." *PLoS One* 8(6): e66356.
- Lieberthal W and Levine JS** (1996). "Mechanisms of apoptosis and its potential role in renal tubular epithelial cell injury." *Am J Physiol* 271(3 Pt 2): F477-488.
- Lin SL, Kisseleva T, Brenner DA and Duffield JS** (2008). "Pericytes and perivascular fibroblasts are the primary source of collagen-producing cells in obstructive fibrosis of the kidney." *Am J Pathol* 173(6): 1617-1627.
- Ling H, Li X, Jha S, Wang W, Karetskaya L, Pratt B and Ledbetter S** (2003). "Therapeutic role of TGF-beta-neutralizing antibody in mouse cyclosporin A nephropathy: morphologic improvement associated with functional preservation." *J Am Soc Nephrol* 14(2): 377-388.
- Linkermann A, Brasen JH, Darding M, Jin MK, Sanz AB, Heller JO, De Zen F, Weinlich R, Ortiz A, Walczak H, Weinberg JM, Green DR, Kunzendorf U and Krautwald S** (2013). "Two independent pathways of regulated necrosis mediate ischemia-reperfusion injury." *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(29): 12024-12029.
- Liu Y** (2004). "Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention." *J Am Soc Nephrol* 15(1): 1-12.
- Liu Y** (2010). "New insights into epithelial-mesenchymal transition in kidney fibrosis." *J Am Soc Nephrol* 21(2): 212-222.
- Lopez-Franco O, Suzuki Y, Sanjuan G, Blanco J, Hernandez-Vargas P, Yo Y, Kopp J, Egido J and Gomez-Guerrero C** (2002). "Nuclear factor-kappa B inhibitors as potential novel anti-inflammatory agents for the treatment of immune glomerulonephritis." *Am J Pathol* 161(4): 1497-1505.
- Lopez-Novoa JM and Nieto MA** (2009). "Inflammation and EMT: an alliance towards organ fibrosis and cancer progression." *EMBO Mol Med* 1(6-7): 303-314.
- Lu ZY, Liu SW, Xie YS, Cui SY, Liu XS, Geng WJ, Hu X, Ji JY and Chen XM** (2013). "Inhibition of the tubular epithelial-to-mesenchymal transition in vivo and in vitro by the Uremic Clearance Granule." *Chin J Integr Med* 19(12): 918-926.
- Lloyd CM, Minto AW, Dorf ME, Proudfoot A, Wells TN, Salant DJ and Gutierrez-Ramos JC** (1997). "RANTES and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) play an important role in the inflammatory phase of crescentic nephritis, but only MCP-1 is involved in crescent formation and interstitial fibrosis." *J Exp Med* 185(7): 1371-1380.

- Malet G, Martin AG, Orzaez M, Vicent MJ, Masip I, Sanclimens G, Ferrer-Montiel A, Mingarro I, Messeguer A, Fearnhead HO and Perez-Paya E** (2006). "Small molecule inhibitors of Apaf-1-related caspase- 3/-9 activation that control mitochondrial-dependent apoptosis." *Cell Death Differ* 13(9): 1523-1532.
- Mantovani A, Allavena P, Sica A and Balkwill F** (2008). "Cancer-related inflammation." *Nature* 454(7203): 436-444.
- Martins L, Ventura A, Branco A, Carvalho MJ, Henriques AC, Dias L, Sarmiento AM and Amil A** (2004). "Cyclosporine versus tacrolimus in kidney transplantation: are there differences in nephrotoxicity?" *Transplant Proc* 36(4): 877-879.
- Matlin KC, Caplan MJ** (2000). "Epithelial cell structure and polarity." Seldin, DW.; Giebisch, G., editors. *The Kidney: Physiology and Pathophysiology*. Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins: 533-567.
- McMorrow T, Gaffney MM, Slattery C, Campbell E and Ryan MP** (2005). "Cyclosporine A induced epithelial-mesenchymal transition in human renal proximal tubular epithelial cells." *Nephrol Dial Transplant* 20(10): 2215-2225.
- Meerum Terwogt JM, ten Bokkel Huinink WW, Schellens JH, Schot M, Mandjes IA, Zurlo MG, Rocchetti M, Rosing H, Koopman FJ and Beijnen JH** (2001). "Phase I clinical and pharmacokinetic study of PNU166945, a novel water-soluble polymer-conjugated prodrug of paclitaxel." *Anticancer Drugs* 12(4): 315-323.
- Meijer L, Flajolet M and Greengard P** (2004). "Pharmacological inhibitors of glycogen synthase kinase 3." *Trends Pharmacol Sci* 25(9): 471-480.
- Meran S and Steadman R** (2011). "Fibroblasts and myofibroblasts in renal fibrosis." *Int J Exp Pathol* 92(3): 158-167.
- Miyajima A, Kosaka T, Seta K, Asano T, Umezawa K and Hayakawa M** (2003). "Novel nuclear factor kappa B activation inhibitor prevents inflammatory injury in unilateral ureteral obstruction." *J Urol* 169(4): 1559-1563.
- Mondragon L, Orzaez M, Sanclimens G, Moure A, Arminan A, Sepulveda P, Messeguer A, Vicent MJ and Perez-Paya E** (2008). "Modulation of cellular apoptosis with apoptotic protease-activating factor 1 (Apaf-1) inhibitors." *J Med Chem* 51(3): 521-529.
- Mondragon L, Galluzzi L, Mouhamad S, Orzaez M, Vicencio JM, Vitale I, Moure A, Messeguer A, Perez-Paya E and Kroemer G** (2009). "A chemical inhibitor of Apaf-1 exerts mitochondrioprotective functions and interferes with the intra-S-phase DNA damage checkpoint." *Apoptosis* 14 (2): 182-190.
- Moreno-Bueno G, Cubillo E, Sarrio D, Peinado H, Rodriguez-Pinilla SM, Villa S, Bolos V, Jorda M, Fabra A, Portillo F, Palacios J and Cano A** (2006). "Genetic profiling of epithelial cells expressing E-cadherin repressors reveals a distinct role for Snail, Slug, and E47 factors in epithelial-mesenchymal transition." *Cancer Res* 66(19): 9543-9556.
- Moreno-Bueno G, Portillo F and Cano A** (2008). "Transcriptional regulation of cell polarity in EMT and cancer." *Oncogene* 27(55): 6958-6969.

- Moreno JA, Izquierdo MC, Sanchez-Nino MD, Suarez-Alvarez B, Lopez-Larrea C, Jakubowski A, Blanco J, Ramirez R, Selgas R, Ruiz-Ortega M, Egido J, Ortiz A and Sanz AB** (2011). "The inflammatory cytokines TWEAK and TNFalpha reduce renal klotho expression through NFkappaB." *J Am Soc Nephrol* 22(7): 1315-1325.
- Moses MA, Brem H and Langer R** (2003). "Advancing the field of drug delivery: taking aim at cancer." *Cancer Cell* 4(5): 337-341.
- Moustakas A and Heldin CH** (2007). "Signaling networks guiding epithelial-mesenchymal transitions during embryogenesis and cancer progression." *Cancer Sci* 98(10): 1512-1520.
- Murugan R and Kellum JA** (2011). "Acute kidney injury: what's the prognosis?" *Nat Rev Nephrol* 7(4): 209-217.
- Myers BD, Ross J, Newton L, Luetscher J and Perlroth M** (1984). "Cyclosporine-associated chronic nephropathy." *N Engl J Med* 311(11): 699-705.
- Naesens M, Kuypers DR and Sarwal M** (2009). "Calcineurin inhibitor nephrotoxicity." *Clin J Am Soc Nephrol* 4(2): 481-508.
- Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Chapman JR and Allen RD** (2004). "Calcineurin inhibitor nephrotoxicity: longitudinal assessment by protocol histology." *Transplantation* 78(4): 557-565.
- Nelson PJ, Ortiz BD, Pattison JM and Krensky AM** (1996). "Identification of a novel regulatory region critical for expression of the RANTES chemokine in activated T lymphocytes." *J Immunol* 157(3): 1139-1148.
- Nelson PJ and Krensky AM** (1998). "Chemokines, lymphocytes and viruses: what goes around, comes around." *Curr Opin Immunol* 10(3): 265-270.
- Neria F, Castilla MA, Sanchez RF, Gonzalez Pacheco FR, Deudero JJ, Calabia O, Tejedero A, Manzarbeitia F, Ortiz A and Caramelo C** (2009). "Inhibition of JAK2 protects renal endothelial and epithelial cells from oxidative stress and cyclosporin A toxicity." *Kidney Int* 75(2): 227-234.
- Ng YY, Huang TP, Yang WC, Chen ZP, Yang AH, Mu W, Nikolic-Paterson DJ, Atkins RC and Lan HY** (1998). "Tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation in progressive tubulointerstitial fibrosis in 5/6 nephrectomized rats." *Kidney Int* 54(3): 864-876.
- Nightingale J, Patel S, Suzuki N, Buxton R, Takagi KI, Suzuki J, Sumi Y, Imaizumi A, Mason RM and Zhang Z** (2004). "Oncostatin M, a cytokine released by activated mononuclear cells, induces epithelial cell-myofibroblast transdifferentiation via Jak/Stat pathway activation." *J Am Soc Nephrol* 15(1): 21-32.
- Nissenson AR, Pereira BJ, Collins AJ and Steinberg EP** (2001). "Prevalence and characteristics of individuals with chronic kidney disease in a large health maintenance organization." *Am J Kidney Dis* 37(6): 1177-1183.
- Ohnuki K, Umezono T, Abe M, Kobayashi T, Kato M, Miyauchi M, Yamamoto N, Kimura M, Toyoda M and Suzuki D** (2012). "Expression of transcription factor Snail and tubulointerstitial fibrosis in progressive nephropathy." *J Nephrol* 25(2): 233-239.

- Okada H, Ban S, Nagao S, Takahashi H, Suzuki H and Neilson EG** (2000). "Progressive renal fibrosis in murine polycystic kidney disease: an immunohistochemical observation." *Kidney Int* 58(2): 587-597.
- Okada H, Inoue T, Kanno Y, Kobayashi T, Ban S, Kalluri R and Suzuki H** (2001). "Renal fibroblast-like cells in Goodpasture syndrome rats." *Kidney Int* 60(2): 597-606.
- Olsen TS, Olsen HS and Hansen HE** (1985). "Tubular ultrastructure in acute renal failure in man: epithelial necrosis and regeneration." *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 406(1): 75-89.
- Ortega A, Ramila D, Ardura JA, Esteban V, Ruiz-Ortega M, Barat A, Gazapo R, Bosch RJ and Esbrit P** (2006). "Role of parathyroid hormone-related protein in tubulointerstitial apoptosis and fibrosis after folic acid-induced nephrotoxicity." *J Am Soc Nephrol* 17(6): 1594-1603.
- Ortiz A, Lorz C, Catalan M, Ortiz A, Coca S and Egido J** (1998). "Cyclosporine A induces apoptosis in murine tubular epithelial cells: role of caspases." *Kidney Int Suppl* 68: S25-29.
- Ortiz A** (2000). "Nephrology forum: apoptotic regulatory proteins in renal injury." *Kidney Int* 58(1): 467-485.
- Ortiz A, Lorz C, Catalan MP, Danoff TM, Yamasaki Y, Egido J and Neilson EG** (2000). "Expression of apoptosis regulatory proteins in tubular epithelium stressed in culture or following acute renal failure." *Kidney Int* 57(3): 969-981.
- Ortiz A, Lorz C, Justo P, Catalan MP and Egido J** (2001). "Contribution of apoptotic cell death to renal injury." *J Cell Mol Med* 5(1): 18-32.
- Ortiz A, Justo P, Sanz A, Lorz C and Egido J** (2003). "Targeting apoptosis in acute tubular injury." *Biochem Pharmacol* 66(8): 1589-1594.
- Ortiz A, Sanchez-Nino MD, Izquierdo MC, Blanco-Colio LM, Selgas R, Ruiz-Ortega M, Egido J and Sanz AB** (2011). "TWEAK and the kidney: the dual role of a multifunctional cytokine." *Adv Exp Med Biol* 691: 323-335.
- Pack DW, Hoffman AS, Pun S and Stayton PS** (2005). "Design and development of polymers for gene delivery." *Nat Rev Drug Discov* 4(7): 581-593.
- Pallet N and Legendre C** (2010). "Deciphering calcineurin inhibitor nephrotoxicity: a pharmacological approach." *Pharmacogenomics* 11(10): 1491-1501.
- Pallet N, Thervet E and Anglicheau D** (2012). "c-Jun-N-Terminal Kinase Signaling Is Involved in Cyclosporine-Induced Epithelial Phenotypic Changes." *J Transplant* 2012: 348604.
- Panzer U, Schneider A, Wilken J, Thompson DA, Kent SB and Stahl RA** (1999). "The chemokine receptor antagonist AOP-RANTES reduces monocyte infiltration in experimental glomerulonephritis." *Kidney Int* 56(6): 2107-2115.
- Paust HJ, Turner JE, Riedel JH, Disteldorf E, Peters A, Schmidt T, Krebs C, Velden J, Mittrucker HW, Steinmetz OM, Stahl RA and Panzer U** (2012). "Chemokines play a critical role in the cross-regulation of Th1 and Th17 immune responses in murine crescentic glomerulonephritis." *Kidney Int* 82(1): 72-83.

- Peinado H, Marin F, Cubillo E, Stark HJ, Fusenig N, Nieto MA and Cano A** (2004). "Snail and E47 repressors of E-cadherin induce distinct invasive and angiogenic properties in vivo." *J Cell Sci* 117(Pt 13): 2827-2839.
- Peinado H, Portillo F and Cano A** (2004). "Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis." *Int J Dev Biol* 48(5-6): 365-375.
- Peinado H, Olmeda D and Cano A** (2007). "Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype?" *Nat Rev Cancer* 7(6): 415-428.
- Perez de Lema G, Maier H, Franz TJ, Escribese M, Chilla S, Segerer S, Camarasa N, Schmid H, Banas B, Kalaydjiev S, Busch DH, Pfeffer K, Mampaso F, Schlondorff D and Luckow B** (2005). "Chemokine receptor Ccr2 deficiency reduces renal disease and prolongs survival in MRL/lpr lupus-prone mice." *J Am Soc Nephrol* 16(12): 3592-3601.
- Polette M, Mestdagt M, Bindels S, Nawrocki-Raby B, Hunziker W, Foidart JM, Birembaut P and Gilles C** (2007). "Beta-catenin and ZO-1: shuttle molecules involved in tumor invasion-associated epithelial-mesenchymal transition processes." *Cells Tissues Organs* 185(1-3): 61-65.
- Prozialeck WC and Edwards JR** (2007). "Cell adhesion molecules in chemically-induced renal injury." *Pharmacol Ther* 114(1): 74-93.
- Qin H, Wilson CA, Lee SJ, Zhao X and Benveniste EN** (2005). "LPS induces CD40 gene expression through the activation of NF-kappaB and STAT-1alpha in macrophages and microglia." *Blood* 106(9): 3114-3122.
- Rastaldi MP, Ferrario F, Giardino L, Dell'Antonio G, Grillo C, Grillo P, Strutz F, Muller GA, Colasanti G and D'Amico G** (2002). "Epithelial-mesenchymal transition of tubular epithelial cells in human renal biopsies." *Kidney Int* 62(1): 137-146.
- Remuzzi G and Perico N** (1995). "Cyclosporine-induced renal dysfunction in experimental animals and humans." *Kidney Int Suppl* 52: S70-74.
- Renard P, Zachary MD, Bougelet C, Mirault ME, Haegeman G, Remacle J and Raes M** (1997). "Effects of antioxidant enzyme modulations on interleukin-1-induced nuclear factor kappa B activation." *Biochem Pharmacol* 53(2): 149-160.
- Revenu C and Gilmour D** (2009). "EMT 2.0: shaping epithelia through collective migration." *Curr Opin Genet Dev* 19(4): 338-342.
- Rhyu DY, Yang Y, Ha H, Lee GT, Song JS, Uh ST and Lee HB** (2005). "Role of reactive oxygen species in TGF-beta1-induced mitogen-activated protein kinase activation and epithelial-mesenchymal transition in renal tubular epithelial cells." *J Am Soc Nephrol* 16(3): 667-675.
- Riedl SJ and Salvesen GS** (2007). "The apoptosome: signalling platform of cell death." *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(5): 405-413.
- Ringsdorf H** (1975). "Structure and properties of pharmacologically active polymers." *J. Polym. Sci. C-Polym. Symp* 51: 135-153.
- Roche JK, Keepers TR, Gross LK, Seaner RM and Obrig TG** (2007). "CXCL1/KC and CXCL2/MIP-2 are critical effectors and potential targets for therapy of Escherichia coli O157:H7-associated renal inflammation." *Am J Pathol* 170(2): 526-537.

**Rodriguez-Diez R, Carvajal-Gonzalez G, Sanchez-Lopez E, Rodriguez-Vita J, Rodriguez Diez R, Selgas R, Ortiz A, Egido J, Mezzano S and Ruiz-Ortega M** (2008). "Pharmacological modulation of epithelial mesenchymal transition caused by angiotensin II. Role of ROCK and MAPK pathways." *Pharm Res* 25(10): 2447-2461.

**Rovin BH, Doe N and Tan LC** (1996). "Monocyte chemoattractant protein-1 levels in patients with glomerular disease." *Am J Kidney Dis* 27(5): 640-646.

**Ruiz-Ortega M, Ortiz A and Ramos AM** (2014). "Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) and kidney disease." *Curr Opin Nephrol Hypertens* 23(1): 93-100.

**Ryffel B, Weber E and Mihatsch MJ** (1994). "Nephrotoxicity of immunosuppressants in rats: comparison of macrolides with cyclosporin." *Exp Nephrol* 2(6): 324-333.

**Saad S, Stanners SR, Yong R, Tang O and Pollock CA** (2010). "Notch mediated epithelial to mesenchymal transformation is associated with increased expression of the Snail transcription factor." *Int J Biochem Cell Biol* 42(7): 1115-1122.

**Sanchez-Nino MD, Benito-Martin A, Goncalves S, Sanz AB, Ucero AC, Izquierdo MC, Ramos AM, Berzal S, Selgas R, Ruiz-Ortega M, Egido J and Ortiz A** (2010). "TNF superfamily: a growing saga of kidney injury modulators." *Mediators Inflamm* 2010.

**Sanchez-Nino MD, Poveda J, Sanz AB, Mezzano S, Carrasco S, Fernandez-Fernandez B, Burkly LC, Nair V, Kretzler M, Hodgin JB, Ruiz-Ortega M, Selgas R, Egido J and Ortiz A** (2013). "Fn14 in podocytes and proteinuric kidney disease." *Biochim Biophys Acta* 1832(12): 2232-2243.

**Santamaria B, Benito-Martin A, Ucero AC, Aroeira LS, Reyero A, Vicent MJ, Orzaez M, Celdran A, Esteban J, Selgas R, Ruiz-Ortega M, Cabrera ML, Egido J, Perez-Paya E and Ortiz A** (2009). "A nanoconjugate Apaf-1 inhibitor protects mesothelial cells from cytokine-induced injury." *PLoS One* 4(8): e6634.

**Sanz AB, Santamaria B, Ruiz-Ortega M, Egido J and Ortiz A** (2008). "Mechanisms of renal apoptosis in health and disease." *J Am Soc Nephrol* 19(9): 1634-1642.

**Sanz AB, Sanchez-Nino MD, Izquierdo MC, Jakubowski A, Justo P, Blanco-Colio LM, Ruiz-Ortega M, Egido J and Ortiz A** (2009). "Tweak induces proliferation in renal tubular epithelium: a role in uninephrectomy induced renal hyperplasia." *J Cell Mol Med* 13(9B): 3329-3342.

**Sanz AB, Sanchez-Nino MD, Izquierdo MC, Jakubowski A, Justo P, Blanco-Colio LM, Ruiz-Ortega M, Selgas R, Egido J and Ortiz A** (2010). "TWEAK activates the non-canonical NFkappaB pathway in murine renal tubular cells: modulation of CCL21." *PLoS One* 5(1): e8955.

**Sanz AB, Sanchez-Nino MD, Ramos AM, Moreno JA, Santamaria B, Ruiz-Ortega M, Egido J and Ortiz A** (2010). "NF-kappaB in renal inflammation." *J Am Soc Nephrol* 21(8): 1254-1262.

**Sanz AB, Sanchez-Nino MD and Ortiz A** (2011). "TWEAK, a multifunctional cytokine in kidney injury." *Kidney Int* 80(7): 708-718.

**Sanz AB, Sanchez-Nino MD, Martin-Cleary C, Ortiz A and Ramos AM** (2013). "Progress in the development of animal models of acute kidney injury and its impact on drug discovery." *Expert Opin Drug Discov* 8(7): 879-895.



- Sarro E, Jacobs-Cacha C, Itarte E and Meseguer A** (2012). "A pharmacologically-based array to identify targets of cyclosporine A-induced toxicity in cultured renal proximal tubule cells." *Toxicol Appl Pharmacol* 258(2): 275-287.
- Sasaki CY, Barberi TJ, Ghosh P and Longo DL** (2005). "Phosphorylation of RelA/p65 on serine 536 defines an I $\kappa$ B $\alpha$ -independent NF- $\kappa$ B pathway." *J Biol Chem* 280(41): 34538-34547.
- Schneeberger EE and Lynch RD** (2004). "The tight junction: a multifunctional complex." *Am J Physiol Cell Physiol* 286(6): C1213-1228.
- Schneider A, Panzer U, Zahner G, Wenzel U, Wolf G, Thaiss F, Helmchen U and Stahl RA** (1999). "Monocyte chemoattractant protein-1 mediates collagen deposition in experimental glomerulonephritis by transforming growth factor-beta." *Kidney Int* 56(1): 135-144.
- Segerer S, Nelson PJ and Schlondorff D** (2000). "Chemokines, chemokine receptors, and renal disease: from basic science to pathophysiologic and therapeutic studies." *J Am Soc Nephrol* 11(1): 152-176.
- Sekine M, Monkawa T, Morizane R, Matsuoka K, Taya C, Akita Y, Joh K, Itoh H, Hayashi M, Kikkawa Y, Kohno K, Suzuki A and Yonekawa H** (2012). "Selective depletion of mouse kidney proximal straight tubule cells causes acute kidney injury." *Transgenic Res* 21(1): 51-62.
- Seoane J** (2006). "Escaping from the TGFbeta anti-proliferative control." *Carcinogenesis* 27(11): 2148-2156.
- Seymour LW** (1991). *J. Bioact. Comp. Polymers* 6.
- Shimizu A and Yamanaka N** (1993). "Apoptosis and cell desquamation in repair process of ischemic tubular necrosis." *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 64(3): 171-180.
- Shimizu A, Kitamura H, Masuda Y, Ishizaki M, Sugisaki Y and Yamanaka N** (1997). "Rare glomerular capillary regeneration and subsequent capillary regression with endothelial cell apoptosis in progressive glomerulonephritis." *Am J Pathol* 151(5): 1231-1239.
- Shimizu H, Maruyama S, Yuzawa Y, Kato T, Miki Y, Suzuki S, Sato W, Morita Y, Maruyama H, Egashira K and Matsuo S** (2003). "Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy attenuates renal injury induced by protein-overload proteinuria." *J Am Soc Nephrol* 14(6): 1496-1505.
- Shin DH, Park HM, Jung KA, Choi HG, Kim JA, Kim DD, Kim SG, Kang KW, Ku SK, Kensler TW and Kwak MK** (2010). "The NRF2-heme oxygenase-1 system modulates cyclosporin A-induced epithelial-mesenchymal transition and renal fibrosis." *Free Radic Biol Med* 48(8): 1051-1063.
- Shook D and Keller R** (2003). "Mechanisms, mechanics and function of epithelial-mesenchymal transitions in early development." *Mech Dev* 120(11): 1351-1383.
- Slattery C, Campbell E, McMorro T and Ryan MP** (2005). "Cyclosporine A-induced renal fibrosis: a role for epithelial-mesenchymal transition." *Am J Pathol* 167(2): 395-407.
- Slattery C, McMorro T and Ryan MP** (2006). "Overexpression of E2A proteins induces epithelial-mesenchymal transition in human renal proximal tubular epithelial cells suggesting a potential role in renal fibrosis." *FEBS Lett* 580(17): 4021-4030.

**Smith JP, Pozzi A, Dhawan P, Singh AB and Harris RC** (2009). "Soluble HB-EGF induces epithelial-to-mesenchymal transition in inner medullary collecting duct cells by upregulating Snail-2." *Am J Physiol Renal Physiol* 296(5): F957-965.

**Solez K, Morel-Maroger L and Sraer JD** (1979). "The morphology of "acute tubular necrosis" in man: analysis of 57 renal biopsies and a comparison with the glycerol model." *Medicine (Baltimore)* 58(5): 362-376.

**Spradley FT, De Miguel C, Hobbs J, Pollock DM and Pollock JS** (2013). "Mycophenolate mofetil prevents high-fat diet-induced hypertension and renal glomerular injury in Dahl SS rats." *Physiol Rep* 1(6): e00137.

**Staples A and Wong C** (2010). "Risk factors for progression of chronic kidney disease." *Curr Opin Pediatr* 22(2): 161-169.

**Steinhilber U, Weiske J, Badock V, Tauber R, Bommert K and Huber O** (2001). "Cleavage and shedding of E-cadherin after induction of apoptosis." *J Biol Chem* 276(7): 4972-4980.

**Strutz F and Muller GA** (1999). "Interstitial pathomechanisms underlying progressive tubulointerstitial damage." *Kidney Blood Press Res* 22(1-2): 71-80.

**Tang WW, Qi M and Warren JS** (1996). "Monocyte chemoattractant protein 1 mediates glomerular macrophage infiltration in anti-GBM Ab GN." *Kidney Int* 50(2): 665-671.

**Ten Dijke P and Hill CS** (2004). "New insights into TGF-beta-Smad signalling." *Trends Biochem Sci* 29(5): 265-273.

**Tepass U, Truong K, Godt D, Ikura M and Peifer M** (2000). "Cadherins in embryonic and neural morphogenesis." *Nat Rev Mol Cell Biol* 1(2): 91-100.

**Thorburn A** (2004). "Death receptor-induced cell killing." *Cell Signal* 16(2): 139-144.

**Thornberry NA and Lazebnik Y** (1998). "Caspases: enemies within." *Science* 281(5381): 1312-1316.

**Tomita N, Morishita R, Lan HY, Yamamoto K, Hashizume M, Notake M, Toyosawa K, Fujitani B, Mu W, Nikolic-Paterson DJ, Atkins RC, Kaneda Y, Higaki J and Ogihara T** (2000). "In vivo administration of a nuclear transcription factor-kappaB decoy suppresses experimental crescentic glomerulonephritis." *J Am Soc Nephrol* 11(7): 1244-1252.

**Tschopp J, Martinon F and Burns K** (2003). "NALPs: a novel protein family involved in inflammation." *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(2): 95-104.

**Ucero AC, Benito-Martin A, Fuentes-Calvo I, Santamaria B, Blanco J, Lopez-Novoa JM, Ruiz-Ortega M, Egido J, Burkly LC, Martinez-Salgado C and Ortiz A** (2013). "TNF-related weak inducer of apoptosis (TWEAK) promotes kidney fibrosis and Ras-dependent proliferation of cultured renal fibroblast." *Biochim Biophys Acta* 1832(10): 1744-1755.

**Ueda N, Kaushal GP and Shah SV** (2000). "Apoptotic mechanisms in acute renal failure." *Am J Med* 108(5): 403-415.

**Van Berendoncks AM, Elseviers MM, Lins RL and Sharf Study Group** (2010). "Outcome of acute kidney injury with different treatment options: long-term follow-up." *Clin J Am Soc Nephrol* 5(10): 1755-1762.



- Van Meeteren LA and ten Dijke P** (2012). "Regulation of endothelial cell plasticity by TGF-beta." *Cell Tissue Res* 347(1): 177-186.
- Vasey PA, Kaye SB, Morrison R, Twelves C, Wilson P, Duncan R, Thomson AH, Murray LS, Hilditch TE, Murray T, Burtles S, Fraier D, Frigerio E and Cassidy J** (1999). "Phase I clinical and pharmacokinetic study of PK1 [N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymer doxorubicin]: first member of a new class of chemotherapeutic agents-drug-polymer conjugates. Cancer Research Campaign Phase I/II Committee." *Clin Cancer Res* 5(1): 83-94.
- Vega S, Morales AV, Ocana OH, Valdes F, Fabregat I and Nieto MA** (2004). "Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death." *Genes Dev* 18(10): 1131-1143.
- Vercauteren SB, Bosmans JL, Elseviers MM, Verpooten GA and De Broe ME** (1998). "A meta-analysis and morphological review of cyclosporine-induced nephrotoxicity in autoimmune diseases." *Kidney Int* 54(2): 536-545.
- Vicent MJ and Perez-Paya E** (2006). "Poly-L-glutamic acid (PGA) aided inhibitors of apoptotic protease activating factor 1 (Apaf-1): an antiapoptotic polymeric nanomedicine." *J Med Chem* 49(13): 3763-3765.
- Vielhauer V, Eis V, Schlondorff D and Anders HJ** (2004). "Identifying chemokines as therapeutic targets in renal disease: lessons from antagonist studies and knockout mice." *Kidney Blood Press Res* 27(4): 226-238.
- Vinas JL, Hotter G, Pi F, Palacios L and Sola A** (2007). "Role of peroxynitrite on cytoskeleton alterations and apoptosis in renal ischemia-reperfusion." *Am J Physiol Renal Physiol* 292(6): F1673-1680.
- Vongwiwatana A, Tasanarong A, Rayner DC, Melk A and Halloran PF** (2005). "Epithelial to mesenchymal transition during late deterioration of human kidney transplants: the role of tubular cells in fibrogenesis." *Am J Transplant* 5(6): 1367-1374.
- Vos IH, Govers R, Grone HJ, Kleij L, Schurink M, De Weger RA, Goldschmeding R and Rabelink TJ** (2000). "NFkappaB decoy oligodeoxynucleotides reduce monocyte infiltration in renal allografts." *FASEB J* 14(5): 815-822.
- Wada T, Yokoyama H, Su SB, Mukaida N, Iwano M, Dohi K, Takahashi Y, Sasaki T, Furuichi K, Segawa C, Hisada Y, Ohta S, Takasawa K, Kobayashi K and Matsushima K** (1996). "Monitoring urinary levels of monocyte chemotactic and activating factor reflects disease activity of lupus nephritis." *Kidney Int* 49(3): 761-767.
- Wada T, Furuichi K, Sakai N, Iwata Y, Kitagawa K, Ishida Y, Kondo T, Hashimoto H, Ishiwata Y, Mukaida N, Tomosugi N, Matsushima K, Egashira K and Yokoyama H** (2004). "Gene therapy via blockade of monocyte chemoattractant protein-1 for renal fibrosis." *J Am Soc Nephrol* 15(4): 940-948.
- Wada T, Sakai N, Matsushima K and Kaneko S** (2007). "Fibrocytes: a new insight into kidney fibrosis." *Kidney Int* 72(3): 269-273.
- Wagner E and Kloeckner J** (2005). "Adv. Polymer Sci." 192.
- Wang X, Zhou Y, Tan R, Xiong M, He W, Fang L, Wen P, Jiang L and Yang J** (2010). "Mice lacking the matrix metalloproteinase-9 gene reduce renal interstitial fibrosis in obstructive nephropathy." *Am J Physiol Renal Physiol* 299(5): F973-982.

- Wang Y, Huang WC, Wang CY, Tsai CC, Chen CL, Chang YT, Kai JI and Lin CF** (2009). "Inhibiting glycogen synthase kinase-3 reduces endotoxaemic acute renal failure by down-regulating inflammation and renal cell apoptosis." *Br J Pharmacol* 157(6): 1004-1013.
- Weber C, Alon R, Moser B and Springer TA** (1996). "Sequential regulation of alpha 4 beta 1 and alpha 5 beta 1 integrin avidity by CC chemokines in monocytes: implications for transendothelial chemotaxis." *J Cell Biol* 134(4): 1063-1073.
- Webster AC, Woodroffe RC, Taylor RS, Chapman JR and Craig JC** (2005). "Tacrolimus versus ciclosporin as primary immunosuppression for kidney transplant recipients: meta-analysis and meta-regression of randomised trial data." *BMJ* 331(7520): 810.
- Wenzel U, Schneider A, Valente AJ, Abboud HE, Thaiss F, Helmchen UM and Stahl RA** (1997). "Monocyte chemoattractant protein-1 mediates monocyte/macrophage influx in anti-thymocyte antibody-induced glomerulonephritis." *Kidney Int* 51(3): 770-776.
- Wilson PD** (2011). "Apico-basal polarity in polycystic kidney disease epithelia." *Biochim Biophys Acta* 1812(10): 1239-1248.
- Wu Y, Deng J, Rychahou PG, Qiu S, Evers BM and Zhou BP** (2009). "Stabilization of snail by NF-kappaB is required for inflammation-induced cell migration and invasion." *Cancer Cell* 15(5): 416-428.
- Xiao Z, Li C, Shan J, Luo L, Feng L, Lu J, Li S, Long D and Li Y** (2011). "Mechanisms of renal cell apoptosis induced by cyclosporine A: a systematic review of in vitro studies." *Am J Nephrol* 33(6): 558-566.
- Xiao Z, Shan J, Li C, Luo L, Lu J, Li S, Long D and Li Y** (2013). "Mechanisms of cyclosporine-induced renal cell apoptosis: a systematic review." *Am J Nephrol* 37(1): 30-40.
- Xie C, Liu K, Fu Y, Qin X, Jonnala G, Wang T, Wang HW, Maldonado M, Zhou XJ and Mohan C** (2011). "RANTES deficiency attenuates autoantibody-induced glomerulonephritis." *J Clin Immunol* 31(1): 128-135.
- Xiong M, Gong J, Liu Y, Xiang R and Tan X** (2012). "Loss of vitamin D receptor in chronic kidney disease: a potential mechanism linking inflammation to epithelial-to-mesenchymal transition." *Am J Physiol Renal Physiol* 303(7): F1107-1115.
- Xu Y, Wan J, Jiang D and Wu X** (2010). "BMP-7 blocks the cyclosporine-A-induced epithelial-to-mesenchymal transition in renal tubular epithelial cells." *Nephron Exp Nephrol* 114(1): e23-31.
- Yamashita M, Katsumata M, Iwashima M, Kimura M, Shimizu C, Kamata T, Shin T, Seki N, Suzuki S, Taniguchi M and Nakayama T** (2000). "T cell receptor-induced calcineurin activation regulates T helper type 2 cell development by modifying the interleukin 4 receptor signaling complex." *J Exp Med* 191(11): 1869-1879.
- Yang J and Liu Y** (2001). "Dissection of key events in tubular epithelial to myofibroblast transition and its implications in renal interstitial fibrosis." *Am J Pathol* 159(4): 1465-1475.
- Yasumoto K, Okamoto S, Mukaida N, Murakami S, Mai M and Matsushima K** (1992). "Tumor necrosis factor alpha and interferon gamma synergistically induce interleukin 8 production in a human gastric cancer cell line through acting concurrently on AP-1 and NF-kB-like binding sites of the interleukin 8 gene." *J Biol Chem* 267(31): 22506-22511.

- Yokoyama H, Wada T, Furuichi K, Segawa C, Shimizu M, Kobayashi K, Su S, Mukaida N and Matsushima K** (1998). "Urinary levels of chemokines (MCAF/MCP-1, IL-8) reflect distinct disease activities and phases of human IgA nephropathy." *J Leukoc Biol* 63(4): 493-499.
- Yoshimura A, Wakabayashi Y and Mori T** (2010). "Cellular and molecular basis for the regulation of inflammation by TGF-beta." *J Biochem* 147(6): 781-792.
- Yoshino J, Monkawa T, Tsuji M, Inukai M, Itoh H and Hayashi M** (2007). "Snail1 is involved in the renal epithelial-mesenchymal transition." *Biochem Biophys Res Commun* 362(1): 63-68.
- Yurkovetskiy AV and Fram RJ** (2009). "XMT-1001, a novel polymeric camptothecin pro-drug in clinical development for patients with advanced cancer." *Adv Drug Deliv Rev* 61(13): 1193-1202.
- Zeisberg M and Duffield JS** (2010). "Resolved: EMT produces fibroblasts in the kidney." *J Am Soc Nephrol* 21(8): 1247-1253.
- Zeisberg M and Kalluri R** (2004). "The role of epithelial-to-mesenchymal transition in renal fibrosis." *J Mol Med (Berl)* 82(3): 175-181.
- Zeisberg M and Kalluri R** (2008). "Fibroblasts emerge via epithelial-mesenchymal transition in chronic kidney fibrosis." *Front Biosci* 13: 6991-6998.
- Zeisberg M and Neilson EG** (2009). "Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions." *J Clin Invest* 119(6): 1429-1437.
- Zhang MZ, Yao B, Yang S, Jiang L, Wang S, Fan X, Yin H, Wong K, Miyazawa T, Chen J, Chang I, Singh A and Harris RC** (2012). "CSF-1 signaling mediates recovery from acute kidney injury." *J Clin Invest* 122(12): 4519-4532.
- Zhang YX, Zhang JR and Wang ZG** (2013). "Mycophenolate mofetil affects monocyte Toll-like receptor 4 signaling during mouse renal ischemia/reperfusion injury." *Chin Med J (Engl)* 126(7): 1224-1229.
- Zhao Y, Banerjee S, Dey N, LeJeune WS, Sarkar PS, Brobey R, Rosenblatt KP, Tilton RG and Choudhary S** (2011). "Klotho depletion contributes to increased inflammation in kidney of the db/db mouse model of diabetes via RelA (serine)536 phosphorylation." *Diabetes* 60(7): 1907-1916.
- Zheng G, Lyons JG, Tan TK, Wang Y, Hsu TT, Min D, Succar L, Rangan GK, Hu M, Henderson BR, Alexander SI and Harris DC** (2009). "Disruption of E-cadherin by matrix metalloproteinase directly mediates epithelial-mesenchymal transition downstream of transforming growth factor-beta1 in renal tubular epithelial cells." *Am J Pathol* 175(2): 580-591.
- Zhong Z, Connor HD, Li X, Mason RP, Forman DT, Lemasters JJ and Thurman RG** (2006). "Reduction of ciclosporin and tacrolimus nephrotoxicity by plant polyphenols." *J Pharm Pharmacol* 58(11): 1533-1543.
- Zhou BP, Deng J, Xia W, Xu J, Li YM, Gunduz M and Hung MC** (2004). "Dual regulation of Snail by GSK-3beta-mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition." *Nat Cell Biol* 6(10): 931-940.

**Zimmerhackl LB, Mesa H, Kramer F, Kolmel C, Wiegele G and Brandis M** (1997). "Tubular toxicity of cyclosporine A and the influence of endothelin-1 in renal cell culture models (LLC-PK1 and MDCK)." *Pediatr Nephrol* 11(6): 778-783.

**Zoja C, Benigni A and Remuzzi G** (2013). "The Nrf2 pathway in the progression of renal disease." *Nephrol Dial Transplant*.

*Artículos publicados*

